

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Beermann, Tübingen

**GENAKTIVITÄTEN IN DEN RIESENCHROMOSOMEN  
VON CHIRONOMUS TENTANS  
UND IHRE BEZIEHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG  
I. GENAKTIVIERUNGEN DURCH ECDYSON**

Von

ULRICH CLEVER

Mit 26 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1961)

**Inhaltsübersicht**

|  | Seite |
|--|-------|
| A. Einleitung . . . . .  | 607   |
| B. Material und Methoden . . . . .   | 609   |
| 1. Material . . . . .  | 609   |
| 2. Präparationstechnik . . . . .   | 609   |
| 3. Das Experiment . . . . .  | 610   |
| C. Die verschiedenen Genreaktionen . . . . .                                     | 610   |
| 1. Der Puff I-18-C . . . . .   | 612   |
| 2. Der Puff IV-2-B . . . . .   | 630   |
| 3. Der Puff I-19-A . . . . .   | 642   |
| 4. Entwicklungsunspezifische Puffs . . . . .                                     | 652   |
| 5. Spät aktivierte, vorpuppenspezifische Puffs . . . . .                         | 660   |
| 6. Nicht-reagierende puffbildende Gene . . . . .                                 | 664   |
| D. Die Genreaktionen und das Entwicklungsgeschehen in der Metamorphose . . . . . | 666   |
| Summary . . . . .  | 672   |
| Literatur . . . . .  | 674   |

**A. Einleitung**

Der Beginn einer Häutung bedeutet für den größten Teil der Zellen einer Insektenlarve den Beginn einer Phase ganz spezifischer Leistungen. Diese Leistungen können etwa in der Bildung einer neuen Kutikula, in Wachstumsprozessen, Differenzierungsvorgängen einzelner Zellen oder wenigzelliger Organe, Drüsenaktivitäten, aber auch im Zerfall durch Histolyse und vielem anderen bestehen. Besonders intensiv untersucht ist das Verhalten der Epidermis und die Differenzierungsleistungen der von ihr abstammenden Kleinorgane (vgl. z. B. KÜHN und PIEPHO 1938, HENKE 1953, WIGGLESWORTH 1953, CLEVER 1958). Das Reaktions- und Differenzierungsverhalten der verschiedenen Zellen ist mit dem jeweiligen Entwicklungszustand der Larve korreliert. Die Korrelation erfolgt über ein Hormonsystem. Wie weit ist nun das genetische Material in den einzelnen Zellen an den Differenzierungsprozessen und ihrer Steuerung beteiligt? Für dieses schon klassische Problem der Entwicklungsphysiologie und Genetik bietet die Zelldifferenzierung in der Spätentwicklung der Insekten einen ganz neuen Angriffspunkt.

Die hochpolytänen Riesenchromosomen, die in manchen Geweben der Dipterenlarven vorkommen, zeigen nämlich ein gewebespezifisches Muster von Strukturmodifikationen, das während der Larvenentwicklung spezifische Veränderungen erfährt (BEERMANN 1952; MECHELKE 1953, 1958; BREUER und PAVAN 1955; BECKER 1959). Nach der Hypothese BEERMANNs (1952) handelt es sich bei diesen Strukturmodifikationen (Balbiani-Ringen und Puffs) um morphologische Anzeichen für eine Aktivität der dort gelegenen Gene. Diese Hypothese ist inzwischen durch zahlreiche Befunde gut gestützt worden, so daß man sie heute als gesichert ansehen darf (ältere Literatur s. BEERMANN 1959, seitdem PELLING 1959, RUDKIN und WOODS 1959, SIRLIN 1960, BEERMANN 1961). Sie wird dieser Arbeit ohne weitere Diskussion zugrunde gelegt.

Für den Entwicklungsphysiologen bietet sich damit die interessante Möglichkeit, unter Verwendung der Ergebnisse der Arbeiten an Riesenchromosomen einerseits, der entwicklungsphysiologischen Analysen der Insektenentwicklung andererseits, die eingangs gestellte Frage nach der Beteiligung des genetischen Materials an Prozessen der Zelldifferenzierung an einem sehr günstigen Modell in Angriff zu nehmen. Zu einer solchen Untersuchung soll mit dieser Arbeit der Anfang gemacht werden.

Bei der hormonalen Steuerung der Differenzierungsvorgänge in der postembryonalen Insektenentwicklung wirken nach der heute allgemein anerkannten Vorstellung im wesentlichen drei Hormone zusammen (siehe z. B. PIEPHO 1951; WIGGLESWORTH 1954, 1957; KARLSON 1959). Auf einen von Art zu Art wechselnden Reiz hin geben die neurosekretorischen Zellen des Gehirns ein Hormon ab, das die Prothoraxdrüsen zur Ausschüttung ihres Hormons, des Ecdysons, anregt. Das Ecdyson löst dann in den verschiedenen Geweben die zur Häutung führenden Prozesse aus. Ein drittes Hormon schließlich, das von den Corpora allata abgegeben wird, beeinflußt den Charakter der Häutung: ist es in großer Menge vorhanden, so resultiert eine Larvenhäutung, ist seine Menge geringer, eine Puppenhäutung, fehlt es ganz, so ist die nächstfolgende Häutung eine Imaginalhäutung.

Die Grundfunktion der Häutungsauslösung in den einzelnen Geweben kommt also dem Hormon der Prothoraxdrüsen, dem Ecdyson, zu. Es wurde 1954 als erstes und bisher einziges Insektenhormon in kristallisierter Form gewonnen (BUTENANDT und KARLSON 1954). Dadurch ist es möglich, experimentell die häutungstypischen Zelldifferenzierungen in den einzelnen Geweben auszulösen. Die Beschreibung der durch injiziertes Ecdyson ausgelösten Veränderungen des Aktivitätszustandes einzelner Gene in den Riesenchromosomen der Speicheldrüsen ist Gegenstand dieser Arbeit. Als aktiv bezeichnen wir dabei alle Gene, die einen mit unseren Methoden nachweisbaren Puff ausgebildet haben, als

Aktivierung entsprechend die Auflockerung einer euchromatischen Querscheibe zu einem Puff, bzw. die weitere Vergrößerung eines schon vorhandenen Puffs.

Herrn Prof. KARLSON, München, der mir das Ecdyson zur Vertügung stellte, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Nur durch seine großzügige Unterstützung war diese Untersuchung möglich. Frl. H. UPPHOFF verdanke ich sorgfältige Hilfe bei den Experimenten, Herrn E. FREIBERG die Anfertigung der Zeichnungen.

## B. Material und Methoden

### 1. Material

Die Untersuchungen wurden an Laborzuchten von *Chironomus tentans* durchgeführt, und zwar wurden für die ersten Versuche Tiere aus Zuchten genetisch verschiedener Stämme benutzt, später wurde fast ausschließlich mit Inzuchtstämmen gearbeitet, die 1958 aus seit längerem im Labor gehaltenen Wild-Zuchten isoliert worden waren. Unterschiede in der Reaktion, die sich auf genetische Verschiedenheiten des Materials hätten beziehen lassen, wurden nicht beobachtet.

Die Larven wurden nach einer von BEERMANN entwickelten Methode in 0,06%iger Kochsalzlösung gezüchtet. Als Futter dienten Erlenlaub und Brennesselpulver. Die Zuchttemperatur betrug 18° C.

Die Entwicklungsgeschwindigkeit der Tiere in einer Zuchtschale pflegt auch dann, wenn alle Tiere aus einem Gelege stammen, zu variieren. Um trotzdem für die Versuche möglichst gleichartiges Material zu haben, wurden aus solchen Zuchten täglich die Larven, die sich gerade zum letzten (4.) Stadium gehäutet hatten — sie sind an den noch unausgefärbten Kopfkapseln zu erkennen —, abgesammelt und in entsprechend kleinen Tochterkulturen weitergezüchtet. Diese Zuchten enthielten dann, je nach der Ausbeute, etwa 10—40 Larven; die Größe der Zuchtschalen wurde der jeweiligen Anzahl angepaßt. Die Entwicklungsgeschwindigkeiten der Tiere einer Tochterkultur stimmten recht gut überein. Die Entwicklungsgeschwindigkeiten der Tiere in verschiedenen Tochterkulturen waren ebenfalls im allgemeinen gleich, es kamen aber auch immer wieder Kulturen vor, die sich wesentlich schneller oder langsamer als der Durchschnitt entwickelten. Die durchschnittliche Entwicklungsdauer vom Ansetzen einer Tochterkultur bis zur Puppenhäutung der Larven betrug etwa 3 Wochen. Die Vorpuppenphase begann entsprechend einige Tage früher. Für die Versuche wurden Tiere am 4., 8. und größtenteils 12. Tag des letzten Larvenstadiums verwendet. Sie hatten gewöhnlich noch nicht mit der Metamorphose begonnen.

### 2. Präparationstechnik

Für die Chromosomen-Untersuchung wurden in der üblichen Weise Orcein-eisigsäure-Quetschpräparate hergestellt, die dann noch mit Lichtgrün gegengefärbt wurden. Für die Gegenfärbung bewährte sich folgendes Farbmisch am besten:

Stammlösung I: Lichtgrün FS, 0,1% in 96%igem Alkohol.

Stammlösung II: Orange G, 0,2% in 70%igem Alkohol.

Zum Gebrauch wurden die Lösungen im Verhältnis 55:45 gemischt. — Für andere Gewebe sind andere Mischungsverhältnisse erforderlich. — Durch Zugabe von 1—2 Tropfen Eisessig wurde ein  $pH$ -Wert von etwa 5 eingestellt. Die Präparate blieben 2 Tage in dieser Farblösung, anschließend wurden sie ohne weitere Differenzierung in Caedax eingebettet. In gelungenen Präparaten ist das Plasma blaßgrün, die Chromosomen farblos bis auf die Puffs, die Balbiani-Ringe und die Nukleolen, die leuchtend grün erscheinen. Das Querscheibenmuster ist bei dieser

Präparations-Technik nicht ganz so gut erkennbar wie in reinen Karmin- oder Orcein-Essigsäure-Präparaten. Auflockerung einer Querscheibe und ihre Grünfärbung dienten als Kriterium für das Auftreten eines Puffs.

### 3. Das Experiment

Das Ecdyson wurde in zweierlei Form verwendet, als weitgehend gereinigter Extrakt und als kristallisiertes, reines Hormon. Beides wurde aus Puppen von *Bombyx mori* gewonnen. In der Wirkungsweise beider Präparate zeigte sich kein Unterschied, so daß im folgenden nicht angegeben wird, welches Präparat jeweils benutzt wurde. Wesentlich ist nur, daß durch die Verwendung des reinen Hormons gezeigt ist, daß die beobachteten Effekte auf das Hormon selbst zurückgehen und nicht auf eventuell in den anderen Präparaten noch vorhandene Beimengungen.

Die Wirksamkeit des Ecdyson wird gemessen in *Calliphora*-Einheiten (abgekürzt CE; s. KARLSON 1956). Sämtliche Dosisangaben sind in diesen Einheiten gemacht und basieren auf der von Prof. KARLSON im *Calliphora*-Test bestimmten Wirksamkeit der jeweiligen Präparate.

Das Ecdyson wurde in 0,65%iger NaCl-Lösung gelöst injiziert. In der Regel war die zu injizierende Dosis in 3  $\mu$ l Flüssigkeit gelöst, in einigen Fällen — Versuche mit 10 CE Ecdyson — in 2  $\mu$ l. Zur Injektion wurde die abgemessene Menge Lösung in eine feine Glaskanüle aufgesogen und in einen der Nachschieber injiziert; anschließend wurde der Nachschieber abgeschnürt, so daß keine Flüssigkeit wieder austreten konnte.

Bei der gewählten Versuchsmethodik ist es nicht möglich, das Puffmuster der Chromosomen einer Larve vor dem Eingriff zu protokollieren. Da das Puffmuster der Larven einer Tochterkultur jedoch entsprechend ihrer gleichmäßigen Entwicklungsgeschwindigkeit ebenfalls im wesentlichen übereinstimmt, genügt es, das Puffmuster unbehandelter Tiere jeder Kultur zu prüfen, um den Ausgangszustand vor der Injektion kennenzulernen. Einige Versuche, bei denen das Puffmuster der Kontrolltiere sehr ungleich oder der Puff, dessen Beeinflussbarkeit durch das Ecdyson geprüft werden sollte, bereits vorhanden war, wurden verworfen.

In einer besonderen Versuchsserie wurde geprüft, ob injizierte reine NaCl-Lösung bereits einen Einfluß auf die Puffentwicklung hat. Der Vergleich des Puffmusters solcher Larven mit dem hormonbehandelter einerseits, mit dem völlig unbehandelter andererseits zeigte immer völlige Übereinstimmung mit dem der unbehandelten Larven. Als Versuchskontrollen wurden daher nur noch wie oben beschrieben unbehandelte Larven genommen, die den Versuchstieren entsprechend bis zur gleichzeitigen Fixierung gehalten wurden.

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt, die Versuchstiere anschließend wieder in den Zuchtraum zurückgebracht.

### C. Die verschiedenen Genreaktionen

Die auffälligsten Veränderungen im Verlauf der Puppenhäutung zeigen die Epidermis und, als Abkömmlinge von ihr, die Imaginalscheiben. Diese Organe eignen sich daher auch am einfachsten als Kontrollen dafür, ob durch einen experimentellen Eingriff das Häutungsverhalten ausgelöst wird.

In älteren Larven von *Chironomus tentans* sind die Flügel- und Beinimaginalscheiben bereits ziemlich groß und gegliedert (s. Abb. 1a).



Ihre Epidermis ist ein dicht gepacktes, plasmareiches Zylinderepithel; die Kerne liegen bei Aufsicht auf das Totalpräparat eng aneinander. Drei Tage nach der Injektion von 45 CE Ecdyson sind die Thoraxsegmente der Larven, als äußeres Zeichen dafür, daß wir nun Vorpuppen vor uns haben, angeschwollen. Die Imaginalscheiben haben sich stark vergrößert und weiter differenziert: ihre Epidermis ist locker und dünn geworden, ihre Kerne haben im Totalpräparat weiten Abstand von einander. Die Puppenkutikula ist jetzt bereits ausgeschieden und liegt

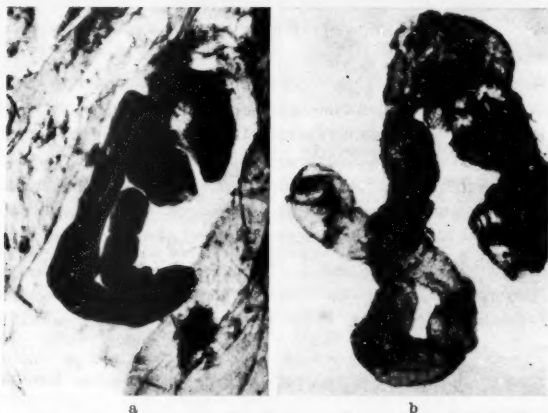


Abb. 1 a u. b. Beinanlagen zweier Larven, die beide am 15. Tag nach der Häutung zum letzten Larvenstadium fixiert wurden. Der Larve in b waren am 12. Tag 45 CE Ecdyson injiziert worden. Vergr. etwa 80 x

der gefalteten Epidermis als dünnes Häutchen an. Abb. 1 zeigt diese Veränderungen an Beinanlagen zweier Larven, die beide am 15. Tag nach der Häutung zum letzten Larvenstadium fixiert wurden. Die Larve in Abb. 1 b erhielt am 12. Tag eine Injektion von 45 CE Ecdyson; die Larve in Abb. 1 a war nicht behandelt worden.

Durch das Ecdyson werden also in unseren Versuchen die typischen Veränderungen an Epidermis und Imaginalscheiben ausgelöst, d.h. es wird das normale Metamorphoseverhalten eingeleitet<sup>1</sup>.

Die verschiedenen Puffs in den Chromosomen von *Chironomus tentans* unterscheiden sich in der Normalentwicklung in dreierlei Weise: in der Größe, die sie erreichen, in ihrer Aktivitätsdauer und in ihrer Beziehung zur Entwicklung (s. CLEVER 1961 b; im folgenden zitiert als Teil II). Die Mehrzahl der Puffs in den Speicheldrüsen ist sehr klein und eignete sich deshalb für Untersuchungen, wie sie hier durchgeführt

<sup>1</sup> Siehe auch Fußnote S. 663.

wurden, wenig. Die Aktivitätsdauer der puffbildenden Gene ist sehr verschieden. Bei Genen mit sehr kurzer Aktivitätsdauer müßte man, um ihr Reagieren unter den Bedingungen des Experiments zu prüfen, Präparate in sehr kurzen Zeitintervallen nach dem experimentellen Eingriff machen, Gene mit längerer Aktivitätsdauer eignen sich deshalb für die Untersuchung besser. Drittens schließlich kann man unterscheiden zwischen Puffs, die nur in bestimmten Entwicklungsabschnitten vorhanden sind, und solchen, die während aller Entwicklungsabschnitte aktiv sein können. Puffs der ersten Gruppe werden als *entwicklungsspezifische*, solche der zweiten Gruppe als *entwicklungsunspezifische* bezeichnet.

Von den uns bekannt gewordenen und von uns untersuchten Gen-Reaktionen sind im folgenden sämtlich die beschrieben, welche in den ersten Stunden nach der Hormon-Injektion erfolgen. Im übrigen sind Beispiele für typische Reaktionsweisen beschrieben. Was die Vollständigkeit betrifft, so ist aber natürlich immer daran zu denken, daß wahrscheinlich nicht alle reagierende Gene gut erkennbare Puffs ausbilden. Die Gene bzw. Puffs, sind nach ihrer Lokalisation in den Chromosomen bezeichnet<sup>1</sup>.

Die Reihenfolge, in der die Genaktivierungen beschrieben werden, folgt der zeitlichen Sequenz ihrer Reaktion nach der Injektion des Hormons.

### 1. Der Puff I-18-C

Nach Injektion von Ecdyson tritt im Abschnitt 18-C des I. Chromosoms (Chromosomenkarten nach BEERMANN 1952, 1955) proximal der dicken Querscheibengruppe, die die Grenze zum Abschnitt 19 bildet, ein Puff auf (Abb. 2).

Die Lokalisation ist bei diesem Puff leicht möglich. Im Abschnitt 18-C sind zwei dünnere Querscheiben die letzten sicher erkennbaren. Die distale von ihnen (Pfeil in Abb. 4a) geht gewöhnlich in den Puff auf und ist dann nicht mehr als scharf konturierte, orceingefärbte Bande erkennbar. Es wurde daher zunächst angenommen, der Puff würde von dieser Scheibe gebildet. In einem in dieser Region ungewöhnlich stark gestreckten Chromosom sind jedoch Scheibe und Puff deutlich von einander getrennt (Abb. 3): der genaue Entstehungsort des Puffs liegt also zwischen der dicken Scheibengruppe und der dünnen proximal folgenden Querscheibe, und zwar in ihrer unmittelbaren Nähe.

<sup>1</sup> Streng genommen dürften wir nur sagen, daß in den einzelnen Chromosomenabschnitten gelegenes genetisches Material bestimmte Reaktionen zeigt. Wenn hier trotzdem abkürzend von „Genen“ gesprochen wird, so soll damit aber natürlich nichts über die genetische Einheit, die an der jeweiligen Reaktion beteiligt ist, ausgesagt werden.

In diesem Gebiet war bisher auch in Präparaten, in denen kein Puff ausgebildet war, keine weitere Querscheibe zu erkennen. Nun hängt allgemein die Anzahl erkennbarer Scheiben in den Riesenchromosomen vom Grad ihrer Streckung ab;

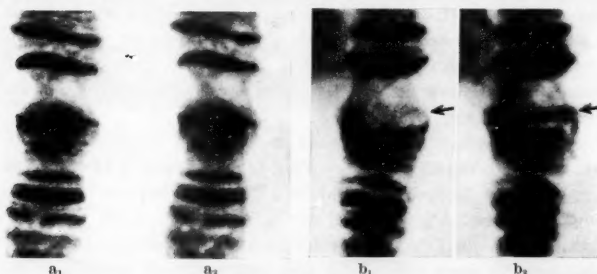


Abb. 2 a u. b. Abschnitte 18 und 19 des I. Chromosoms, zur Demonstration der grün-gefärbten Puffs jedes Chromosom mit Grünfilter ( $a_1, b_1$ ) und Rotfilter ( $a_2, b_2$ ) photographiert. a Unbehandelte Kontroll-Larve, b nach der Injektion von 45 CE Ecdyson; der induzierte Puff I-18-C ist mit Pfeil markiert. Vergr. etwa 1700  $\times$

bei starker Streckung lassen häufig Scheibengruppen, die gewöhnlich einheitlich erscheinen, ihren Aufbau aus einer Anzahl von Scheiben erkennen (s. BEERMANN 1952). Das trifft auch für mehrere Querscheiben des in Abb. 3 dargestellten Chromosoms zu, wie der Vergleich mit den anderen, den gleichen Chromosomenabschnitt darstellenden Abbildungen zeigt. Die puffbildende Querscheibe wird also der in Abb. 4a mit Pfeil bezeichneten sehr eng anliegen und mit ihr gewöhnlich zu einer einheitlichen, d.h. optisch nicht auflösbaren Struktur verschmelzen. Auch andere Puffs lassen, wenn sie nur schwach ausgebildet sind, häufig erkennen, daß sie neben deutlichen Orceinquerscheiben liegen, welche bei größerer Ausbildung des Puffs unsichtbar sind, nicht aber von diesen Querscheiben selbst gebildet werden. Einen Hinweis dafür, daß die Puffs in den Zwischen-scheibenbereichen entstehen statt aus Querscheiben, muß man aber nach dem eben Dargestellten darin nicht sehen.

Da das Aussehen der Region, in welcher der Puff entsteht, auch in den Kontrollen etwas wechseln kann, ist eine genaue Definition nötig, wann hier von einem Puff gesprochen werden soll. Die in Abb. 4a mit Pfeil bezeichnete Querscheibe kann (1) völlig scharf konturiert ausgebildet sein, ohne ein Anzeichen einer Auflockerung oder einer Anfärbung mit Lichtgrün zu zeigen. Häufig (2) ist sie jedoch, vor allem an ihrem distalen Rand, nicht ganz so scharf begrenzt wie die Mehrzahl der übrigen Scheiben; sie kann dann die Andeutung einer Grünfärbung zeigen. In anderen Präparaten ist ein breiterer diffuser Bereich, der sich

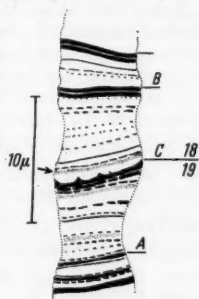


Abb. 3. Abschnitte 18 und 19 des I. Chromosoms aus einem besonders stark gequetschten Präparat. Der induzierte Puff I-18-C ist mit Pfeil markiert

grün anfärbt, ausgebildet; die Orceinquerscheibe ist dann gewöhnlich nicht mehr erkennbar (3). Zweifellos ist jetzt ein schwacher Puff ausgebildet. Zwischen diesen Zuständen gibt es Übergänge, ohne daß eine scharfe, eindeutige Grenzziehung möglich wäre. Willkürlich wurde der oben als (3) beschriebene Zustand als untere Grenze für das Vorhandensein eines Puffs festgesetzt (Abb. 4b). Sämtliche Präparate, in denen nicht mindestens dieser Ausbildungsgrad des Puffs erreicht ist, wurden als negativ gewertet.

Der Vergleich der Puffhäufigkeit im gesamten Versuchsmaterial und in der Kontrolle ergibt, daß der Puff in Abschnitt I-18-C bei 89,8% ( $n=225$ ) der mit Ecdyson behandelten Tieren vorhanden ist, im Gegensatz dazu nur bei 8,1% ( $n=135$ ) der Kontrolltiere. Läßt man aus dem Gesamtmaterial die Tiere weg, welche sehr bald nach der Injektion und die, welche erst nach einem Tag und später fixiert wurden — für sie gelten besondere Verhältnisse, s. unten —, so erhöht sich der Prozentsatz bei den injizierten Tieren auf 96,4%.

Die Fälle, in denen kein Puff auftrat, verteilen sich gleichmäßig über sämtliche Versuchsgruppen, auch die, in denen die Puffbildung besonders stark war. Welche Ursachen der negative Versuchsausfall hat, läßt sich nicht entscheiden; möglicherweise liegen Versuchsfehler vor.

Die hier mitgeteilten Prozentsätze liegen sowohl bei den Versuchstieren als auch bei den Kontrollen etwas höher als in der ersten Mitteilung (CLEVER und KARLSON 1960), deren Material auch in den Zahlen dieser Arbeit enthalten ist. Das liegt hauptsächlich daran, daß wir damals den Puff noch nicht genau definiert hatten und, um bei der noch weniger intimen Kenntnis dieser Chromosomenregion sicher zu gehen, nur besonders deutliche Puffausbildung als positiv werteten. Bei der erneuten Durchsicht für diese Arbeit wurde die Puffausbildung dann in einigen Fällen anders als damals bewertet.

Die Größe des Puffs kann bei verschiedenen Tieren sehr verschieden sein, außerdem kann auch die Intensität seiner Anfärbung mit Lichtgrün variieren. Man könnte daran denken, und besonders die Befunde BECKERS (1959) an *Drosophila* legen den Gedanken nahe, daß man zufällig in verschiedene Entwicklungsphasen der Puffbildung hineingeraten wäre, d.h. einmal einen sich entwickelnden oder bereits sich rückbildenden, ein anderes Mal aber einen voll ausgebildeten Puff vor sich hätte. Da aber der Puff I-18-C zu denen mit langdauernder Aktivitätsphase gehört — wie sich im einzelnen noch zeigen wird —, kann es sich hier nicht nur darum handeln. Man ist daher berechtigt, den Puff in diesen Versuchen als relativ statisches Gebilde zu betrachten und kann versuchen, die unter verschiedenen Versuchsbedingungen erhaltenen Puffgrößen zu vergleichen.

Wie lassen sich Puffgrößen vergleichen? Leider ist es sehr schwierig, Puffgrößen exakt zu messen und zu vergleichen. Die an sich schon geringe Größe der Puffs, dazu hier noch die Nachbarschaft der dicken Orceinquerscheiben, die Unsicherheit einer gleichmäßigen Anfärbung

und schließlich die unterschiedliche Größe der Chromosomen verschiedener Tiere und auch der verschiedenen Zellen der Drüsen eines Tieres entsprechend ihrem unterschiedlichen Polytäniegrad erschweren das sehr. Um trotz dieser Schwierigkeiten für die Untersuchung von den Puffgrößenunterschieden wenigstens einen begrenzten Gebrauch machen zu können, wurden *Größenklassen* für die Puffs festgesetzt, in welche die Tiere nach subjektiver Beurteilung am Mikroskop eingeordnet wurden. Das Klassenschema wurde wie folgt festgelegt (vgl. Abb. 4):

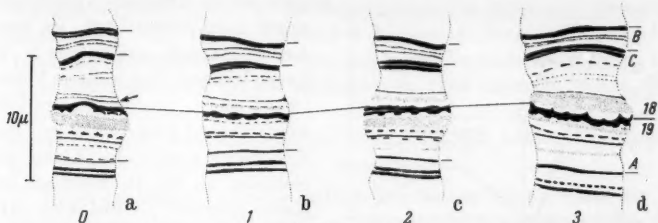


Abb. 4 a—d. Verschiedene Ausbildungsstufen des Puffs 1-18-C. Typische Beispiele für Puffs der verschiedenen Größenklassen (Ziffern unter den Chromosomen). a Aus Kontrolltier, b—d aus Larven nach Injektion von Ecdyson. Der Pfeil in a markiert die Querscheibe, die unmittelbar neben dem Entstehungsort des Puffs liegt und gewöhnlich in ihn aufgeht

*Klasse 0* (Abb. 4a): kein Puff ausgebildet, siehe Definition S. 613f.

*Klasse 1* (Abb. 4b): Orceinquerscheibe gewöhnlich nicht mehr erkennbar, statt dessen schmaler, aufgelockerter und sich grünfärbender Bereich.

*Klasse 2* (Abb. 4c): starke grüne Querzone, Orceinbände nicht mehr erkennbar, aber noch keine Aufblähung des Chromosomenabschnittes.

*Klasse 3* (Abb. 4d): der Puff reicht proximal bis fast an die nächste Querscheibe heran, die dadurch verbogen ist. Sehr intensive Grünfärbung. Durch die starke Aufblähung ist das Chromosom lokal seitlich verdickt.

Die Wahl dieser Größenklassen ist willkürlich; ihr entspricht *keine diskontinuierliche Variabilität der Puffgrößen*. Dementsprechend ist es in manchen Fällen auch willkürlich, ob man ein Präparat der höheren oder der niedrigeren Klasse zuteilt, obgleich die meisten Präparate innerhalb der hierfür möglichst günstig gewählten Grenzen liegen. Um subjektive Fehler durch Voreingenommenheit möglichst auszuschalten, wurden die Protokollnummern der Präparate vor der Bewertung verklebt und die Präparate von Versuchs- und Kontrolltieren chiffriert ausgewertet. Erst nachdem die Auswertung beendet war, wurden die Bewertungen in die Versuchsprotokolle eingetragen. Mehrfache auf diese Weise durchgeführte Bewertungen desselben Materials ergaben nur geringe Abweichungen.

Will man nicht nur die einzelnen Puffs nach diesen Größenklassen ordnen, sondern — wie es hier geschehen soll — die Tiere nach der Größe dieses Puffs in ihren Speicheldrüsen, so setzt das voraus, daß die *Puffausbildung in den verschiedenen Zellen einer Drüse* (bzw. der beiden Drüsen eines Tieres) einheitlich ist. Tatsächlich ist gewöhnlich die Variabilität der Puffgröße in den Zellen eines Tieres gering und bleibt innerhalb der Grenzen einer Klasse. Ausnahmefälle gab es, in denen die Puffgröße deutlich über zwei angrenzende Größenklassen verteilt war;

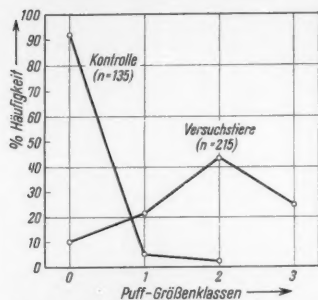


Abb. 5. Häufigkeiten der verschiedenen Größenklassen des Puffs I-18-C im Kontrollmaterial und nach Injektion von Ecdyson. Gesamtmaterial

noch weiter streuende Variabilität wurde nicht beobachtet. Es wurden je Präparat mindestens 5–10 Kerne beurteilt, bei größerer Variabilität mehr, eventuell sämtliche auswertbaren Chromosomen. Das Tier wurde jeweils der Klasse zugewiesen, zu der die Mehrzahl der Kerne gehörte. — Auf eine Abhängigkeit der Variabilität von den Versuchsbedingungen wird noch eingegangen.

Auch die Größenvariabilität der übrigen in dieser Arbeit untersuchten Puffs in den verschiedenen Zellen eines Tieres ist gering.

Vergleicht man, entsprechend unserem Klassifikationsschema, die *Häufigkeit der verschiedenen Puffgrößen bei Kontrollen und injizierten Tieren*, so zeigt sich, daß der Puff auch bei den 8,1% positiv bewerteten Kontrolltieren sehr viel schwächer ausgebildet ist als bei der Mehrzahl der injizierten Tiere (Abb. 5). Das enthebt einen praktisch zunächst der — schwierigen — Entscheidung darüber, ob auch die ganz schwache Auflockerung, die wir als negativ werteten (s. S. 613f), als kleiner Puff anzusehen ist oder nicht. Selbst wenn es so ist, dann ist nun völlig sicher, daß das Ecdyson die Vergrößerung eines Puffs im Abschnitt I-18-C bewirkt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das *Verhalten des Puffs in der Normalentwicklung* ausführlich beschrieben werden, und es wird sich zeigen, daß er für die Vorpuppenphase und andere Häutungsphasen spezifisch ist. Die durch das Ecdyson induzierbaren Puffgrößen sind die, welche auch in der normalen Entwicklung vorkommen. Im größten Teil der Vorpuppenphase bleibt die Puffgröße im Rahmen der Klassen 1 und 2 des gegebenen Klassifizierungsschemas, gegen Ende vergrößert er sich und ist ganz am Ende vielleicht noch größer als die größten in diesen Versuchen beobachteten.

Die induzierte Puff-Bildung ist also zunächst nur ein Kennzeichen dafür, daß durch das Ecdyson Häutungsprozesse eingeleitet sind. Daß das Ecdyson diese Wirkung hat, ist bekannt und wurde oben (S. 611) auch für *Chironomus* bestätigt.

Für die Beurteilung, in welcher Beziehung die Puffinduktion zur Metamorphoseauslösung durch das Ecdyson steht, ist es besonders wichtig, den *Zeitpunkt der Puffinduktion, relativ zur Injektion*, zu kennen. Auf diese Frage war, nachdem die Beeinflußbarkeit der Puffbildung einmal bekannt war, ein großer Teil der Experimente von vornherein wesentlich abgestimmt. Wir fixierten zunächst 8, dann 4, dann 2 Std nach der Injektion und stellten keine Unterschiede im Ergebnis fest (CLEVER und KARLSON 1960). Wir gingen schließlich zu noch kürzeren Zeiten über, wobei wir, unseren inzwischen gewonnenen Erfahrungen über die wirksamste Ecdysondosis entsprechend (s. unten), eine höhere Dosis als in den ersten Versuchen benutzten, nämlich 45 CE.

In einem dieser Versuche stellten wir bereits 15 min nach der Injektion einen Unterschied zwischen Versuchstieren und Kontrollen fest (alle 4 Versuchstiere besaßen den Puff, 3 Kontrolltiere besaßen ihn nicht). Diesen Befund konnten wir jedoch in weiteren Versuchen nicht sicher bestätigen. Die Puffgröße ist so kurz nach der Injektion sehr gering und eine sichere Aussage entsprechend schwierig. Deutlich begonnen hat die Puffbildung dagegen zweifellos 30 min nach der Injektion (vgl. Abb. 6; zu den 13 Tieren dieses Versuchs gehören 12 Kontrolltiere, von denen eins den Puff in der Größe 1 besaß). Berücksichtigt man nun noch, daß von der Aktivierung des Gens bis zur Entwicklung eines deutlichen Puffs auch noch einige Zeit vergehen wird — bis zur vollständigen Ausbildung dauert es 1–2 Std (s. unten) —, so folgt, daß die *Aktivierung des Gens I-18-C sehr bald nach dem Eindringen des Ecdysons in die Zelle einsetzen muß*. Das bedeutet aber, daß zu den allerersten der durch das Ecdyson ausgelösten Prozesse die *Aktivierung eines bestimmten Gens* gehört.

Wieviel Zeit vergeht, bis das injizierte Hormon in die Drüsenzellen eingedrungen ist, läßt sich nicht genau angeben. Leider läßt es sich bisher im Tier nicht lokalisieren. In parallellaufenden Versuchen in unserem Institut injizierte PELLING jedoch mit gleicher Versuchstechnik <sup>3</sup>H-Uridin und studierte dessen Einbau in die Chromosomen im Autoradiogramm (PELLING 1959 und unveröffentlicht). Bereits 10 min nach der Injektion erhielt er eine deutliche Markierung des Nukleolus und der Puffs in den Speicheldrüsenchromosomen. Da die Molekulargewichte von Uridin und Ecdyson etwa in derselben Größenordnung liegen, darf man mit einer ähnlichen Wanderungsgeschwindigkeit auch für das Ecdyson rechnen.



Die Größe des induzierten Puffs ist 30 min nach der Injektion noch gering (Abb. 6). Die Puffs nach 1 Std fixierter Tiere sind jedoch im Durchschnitt größer als die der nach 30 min fixierten, die der nach 2 Std fixierten sind im Durchschnitt noch größer (Abb. 6). Die Häufigkeitsmaxima der Puffgrößen verschieben sich also mit zunehmendem Abstand von der Injektion nach den höheren Größenklassen. Diese Verschiebung heißt, daß der Puff in dieser Zeit noch weiter an Größe zunimmt; die Unterschiede in der durchschnittlichen Puffgröße in Abb. 6

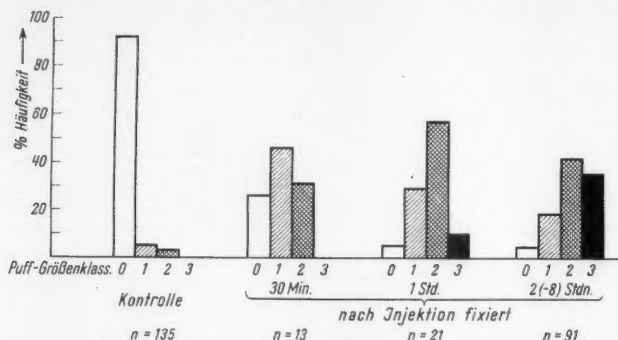


Abb. 6. Häufigkeit der Größenklassen des Puffs I-18-C bei den Tieren, die in den ersten Stunden nach der Injektion des Ecdysons fixiert worden sind

bedeuten hier tatsächlich, daß wir in *verschiedenen Phasen der Puffbildung* fixiert haben. Die Variabilität der Puffgröße in den verschiedenen Zellen einer Drüse, die im allgemeinen gering ist (s. S. 616), ist bei den Tieren, die fixiert wurden, solange der Puff noch im Entstehen ist, auffallend größer als später.

Zwischen den 2, 4, 6 und 8 Std nach der Injektion fixierten Tieren ließen sich in unserem Material, bei im übrigen jeweils gleichen Versuchsbedingungen, keine Unterschiede in der Verteilung auf die Puffgrößenklassen mehr nachweisen. 2 Std nach der Injektion scheint also die induzierbare Puffgröße erreicht zu sein, die sich dann in den nächsten Stunden nicht weiter verändert. Wir konnten daher in den Abbildungen und Tabellen die Versuchsgruppen der 2—8 Std nach der Injektion fixierten Tiere jeweils zu einem Wert zusammenfassen. Die *Dauer der Ausbildung* des Puffs I-18-C beträgt nach diesen Befunden von seiner Aktivierung bis zu der im Experiment erreichten Maximalgröße etwa  $1\frac{1}{2}$  Std.

Die Puffgröße ist jedoch auch bei den zu gleicher Zeit nach der Injektion fixierten Tieren nicht gleich. Innerhalb der Wachstumszeit könnte man diese Größenunterschiede mit verschiedenen Entwicklungs-

geschwindigkeiten in den verschiedenen Tieren erklären. Jedoch auch nach 2—8 Std, also wenn die Puffs ihre Endgröße erreicht haben und sich nicht weiter verändern, gehören sie durchaus nicht derselben Größenklasse an, sondern verteilen sich mit ziemlich starker Variabilität auf sämtliche Größenklassen (Abb. 6). *Auch Puffs gleichen Entwicklungsstadiums können sich also in ihrer Größe unterscheiden. Läßt sich etwas aussagen über Faktoren, welche die Endgröße, die ein Puff erreicht, beeinflussen?*

Die einfachste Annahme wäre, daß die Größe, die der Puff erreicht von der jeweiligen allgemein-physiologischen Situation des Tieres abhinge, also in gewissem Sinne eine Konstante der einzelnen Tiere wäre. Es ist die Frage, *ob sich ein einmal vorhandener Puff in seiner Größe überhaupt noch verändern läßt*, oder ob er auf die Induktion durch das Ecdyson nach einem Alles-oder-Nichts-Typ sofort mit der vollständigen in diesem Falle möglichen Größenausbildung reagiert.

Diese Frage ließe sich aus dem bisher Dargestellten beantworten, wenn man das ganz schwach diffuse Aussehen, das die Querscheibe bei einigen Kontrolltieren zeigt, die hier zur Klasse 0 gezählt werden (s. S. 613), bereits als schwache Aktivität zu deuten hätte (s. dazu Teil II). Dann müßte ein Teil der Genaktivierung durch das Ecdyson auf die Veränderung solcher Puffs zurückgehen. Wir haben es jedoch zunächst offengelassen, ob es sich in solchen Fällen um einen aktiven Locus handelt.

Man kann sich weiter überlegen, ob man nicht den Befund, daß etwa 10% der Tiere auch in den Kontrollen bereits sicher den Puff hatten (s. Abb. 5), für die Entscheidung ausnützen könnte. Denn es ist anzunehmen, daß etwa derselbe Prozentsatz der Versuchstiere ebenfalls den Puff bereits vor der Injektion hatte, und zwar ebenfalls nur in den kleinen Größenklassen wie die Kontrollen. Wenn sich sichern ließe, daß die Verschiebung des Häufigkeitsmaximums nach den größeren Klassen auch diese Tiere betroffen hätte, dann wäre die Veränderungsmöglichkeit auch bereits ausgebildeter Puffs gezeigt. Wahrscheinlich ist es zwar auch so; der Beweis ist aber nicht zu führen. Denn da man über den Ausgangszustand des Einzeltieres nichts weiß, läßt sich nicht ausschließen, daß solche Tiere, die vor der Injektion den Puff bereits in geringer Ausbildung besitzen, nicht weiter reagieren und daher auch nach der Injektion wieder in denselben Größenklassen erscheinen, denen sie vorher zugehörten.

Ein *Beweis der Veränderbarkeit* ist jedoch auf der Linie dieses Gedankenganges möglich. Wie bereits erwähnt, war in einigen Versuchen der Puff bereits in den Kontrollen in mehr oder weniger starker, aber stets deutlicher Ausbildung vorhanden. Dementsprechend sollten ihn auch die Versuchstiere vor der Injektion besitzen. Die Versuche, die

mit diesen Kulturen gemacht wurden, sind im bisher Dargestellten nicht berücksichtigt. Gehören die injizierten Tiere nun im Durchschnitt größeren Klassen an als die Ausgangstiere, so ist damit die Veränderbarkeit des Puffs bewiesen. Zwei Versuche ließen sich für diesen Zweck auswerten — man hat es leider nicht in der Hand, solche Versuche zu planen — sie zeigen einen solchen Unterschied eindeutig genug (Abb. 7). *Der Puff I-18-C reagiert also nicht nach dem Alles-oder-Nichts-Typ, sondern ist durch Ecdyson weiter zu vergrößern.*

Die Untersuchung der Normalentwicklung führte zu dem Ergebnis (Teil II und noch unveröffentlicht), daß das Auftreten des Puffs I-18-C

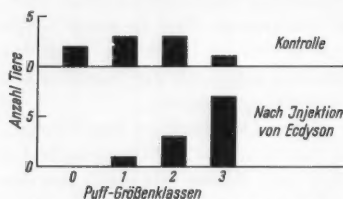


Abb. 7. Häufigkeit der verschiedenen Größenklassen des Puffs I-18-C in jungen Vorpuppen, vor (Kontrolle) und nach der Injektion von Ecdyson (unten)

in einem Tier als erstes Anzeichen für den Beginn von Metamorphose- oder Häutungsprozessen anzusehen ist. Bei den Tieren des soeben beschriebenen Versuchs handelte es sich also um junge Vorpuppen. Entsprechend der Rolle, die das Ecdyson für die Häutungsauslösung einerseits, für die Puffinduktion, wie hier gezeigt wurde, andererseits spielt, darf man bereits aus der Exi-

stenz des Puffs in den Chromosomen eines Tieres in diesen Fällen darauf schließen, daß Ecdyson in seiner Hämolymphe vorhanden war. Die Vergrößerung des Puffs nach Injektion von weiterem Ecdyson bedeutet dann, daß die *Puffgröße von der Konzentration des Ecdysons in der Hämolymphe beeinflusst* wird. Ist das richtig, dann sollte sich der Einfluß der Ecdysonkonzentration auf die Puffgröße auch durch Injektion verschiedener Dosen Ecdyson nachweisen lassen. Wir verwendeten in unseren Versuchen hauptsächlich drei verschiedene Dosen Ecdyson: 10, 15 und 45 CE.

Tatsächlich lassen die Ergebnisse aus sonst vergleichbaren Versuchen (gleiches Alter der Tiere, gleiche Kulturbedingungen) einen *Einfluß der injizierten Dosis auf die Puffgröße* erkennen (Abb. 8, Diagramme  $a_1$ — $a_3$ ): mit Erhöhung der Dosis verschiebt sich die Häufigkeit der induzierten Puffgrößen zu den größeren Klassen.

Versuche mit niedrigeren Ecdysondosen wurden nur in geringer Anzahl durchgeführt. Mit 5 CE Ecdyson ließ sich der Puff ebenfalls noch induzieren. Da die Tiere dieser Versuche außerdem jünger waren als die zu den Versuchen der Abb. 8 verwendeten, ist jedoch ein Größenvergleich nicht sicher durchzuführen.

In der Normalentwicklung tritt der Puff zu Beginn der Vorpuppenphase nur in den Größenklassen 1 und 2 auf. Daß er nach Injektion

häufig die Größenklasse 3 erreicht, ist dann ein Anzeichen für die unphysiologisch hohe Konzentration. Immerhin erreicht ein großer Teil der Puffs, vor allem nach Injektion von 10 oder 15 E nur Größenklassen, die auch für den Beginn der Normalentwicklung typisch sind.

Die Puffgröße variiert auch nach Injektion gleicher Dosen (Abb. 8). Der Eindruck am Präparat läßt diese Variation eher größer denn kleiner erscheinen, als es in den Diagrammen zum Ausdruck kommt. Nun ist die Konzentration in der Hämolymphe allerdings auch dann, wenn die gleiche Dosis injiziert wurde, nicht ganz gleich. Denn trotz der möglichst gleichartigen Zuchtbedingungen variiert die Größe der Tiere beträchtlich. Wieweit das einen Einfluß auf die induzierte Puffgröße hat, wurde nicht geprüft. Außerdem mag ein geringer, von Tier zu Tier wechselnder Hormontiter, der sich nicht erfassen läßt, auch in den unbehandelten Tieren vorhanden sein (s. Teil II). Die Puffgröße scheint jedoch auch noch von anderen Faktoren beeinflußt zu werden, darunter mindestens einigen, die auf das gesamte Puffmuster wirken und nicht für diesen Puff spezifisch sind. Man wird sich vorläufig damit begnügen müssen, dieses als noch nicht näher definierbare „physiologische Situation“ des Tieres zu bezeichnen. Aus unseren Befunden läßt sich dann schließen, daß die Größe, die der Puff unter den jeweiligen physiologischen Bedingungen eines Tieres erreicht, von der Konzentration des Ecdysons in der Hämolymphe bestimmt wird.

Es liegt nahe zu fragen, ob außer der Größe des Puffs I-18-C auch die *Geschwindigkeit seiner Vergrößerung* von der Ecdysondosis abhängt. Das vorliegende Material spricht dagegen, wenn es auch zu klein ist, um eine sichere Entscheidung zu erlauben: Bei den 1 Std nach der Injektion fixierten Tieren ließ sich noch kein Einfluß der Dosis auf die Puffgröße nachweisen. Die Tiere, die 45 CE erhalten hatten, gehörten der Klasse 2 an, während sie nach 2 Std (s. Abb. 8a<sub>3</sub>) größtenteils der Klasse 3 angehörten. Danach ist bei ihnen in 1 Std die Puffentwicklung noch nicht abgeschlossen. Andererseits zeigt sich weder bei denen, die 10 oder 15, noch bei denen, die 45 CE Ecdyson injiziert bekommen hatten, ein Unterschied zwischen den nach 2 und den nach 6 oder 8 Std fixierten Tieren: bei beiden ist danach die Puffbildung nach 2 Std abgeschlossen. Es ist hiernach anzunehmen, daß die Puffentwicklung bei der ersten Gruppe früher als bei der zweiten innerhalb der zweiten Stunde nach der Injektion beendet ist.

Unsere experimentellen Befunde zeigen bisher, daß Auftreten und Größe des Puffs im Abschnitt I-18-C durch das Ecdyson und seine Konzentration in der Hämolymphe bestimmt werden. Damit ist aber noch nicht entschieden, ob der Puff, einmal durch das Ecdyson induziert, auch dann vorhanden und tätig bleibt, wenn das Hormon wieder

verschwindet, oder ob er auf Abnahme des Ecdysontiters nun wieder mit Verkleinerung und eventuell völligem Verschwinden reagiert.

Im Verlaufe der Larvenentwicklung wird der Puff mehrfach neu- und wieder rückgebildet. So ist er in der letzten Larvenhäutung vorhanden,

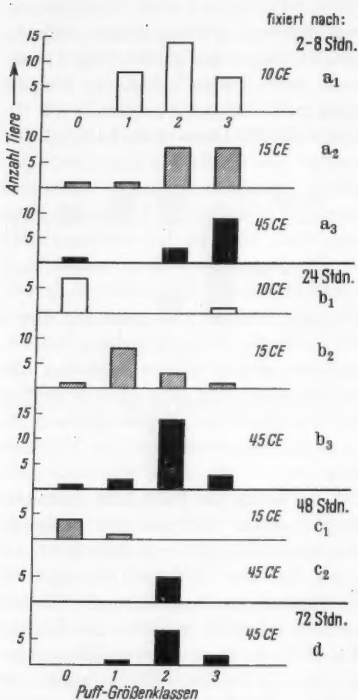


Abb. 8. Häufigkeit der verschiedenen Größenklassen des Puffs I-18-C bei Tieren, denen verschiedene Dosen Ecdyson injiziert und die zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion fixiert worden waren

Puffs schon recht bald (Abb. 8, helle und schraffierte Diagramme, s. auch Abb. 9). Die Dauer bis zur völligen Rückbildung ist konzentrationsabhängig: während nach Injektion von 10 CE der Puff in wohl sämtlichen Fällen bereits nach 24 Std wieder vollständig verschwunden war<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Die eine Ausnahme kann man damit erklären, daß dieses Tier unabhängig von der Injektion bereits mit der Metamorphose begonnen hatte; dafür spricht die für diese Altersgruppe ungewöhnliche Zugehörigkeit zur Größenklasse 3 (s. auch S. 636).

danach verschwindet er wieder (s. Teil II). Auch nach Eintritt der Larve in die Vorpuppenphase kann er wieder verschwinden, wenn die Vorpuppe nochmals in ein diapauseähnliches Stadium zurückfällt (CLEVER, unveröffentlicht). Der Puff wird also in der Normalentwicklung wieder zurückgebildet beim Übergang in Entwicklungsphasen, in denen nach unseren allgemeinen Kenntnissen über die hormonale Entwicklungsregulation der Insekten kein Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist.

Der experimentell induzierte Puff kann ebenfalls wieder rückgebildet werden. Die Frage nach der Beziehung zwischen dieser Rückbildung und dem Ecdyson ist um so interessanter, als bisher über die Verweildauer injizierten Ecdysons in der Hämolymphe nichts bekannt ist.

Nach der Injektion geringer Dosen Ecdyson (10 und 15 CE) — diese Versuche sollen zunächst betrachtet werden —, beginnt die Rückbildung des

ist das nach Injektion von 15 CE erst nach 48 Std der Fall. Die *Rückbildung geht allmählich vor sich*: nach 24 Std ist das Häufigkeitsmaximum der Puff-Größen auch bei den Tieren, die 15 CE bekommen haben, deutlich nach links verschoben; die Puffs sind bereits kleiner geworden.

Um hier unsere Frage, ob der Puff nach Verschwinden des Ecdysons wieder rückgebildet wird, beantworten zu können, ist zunächst die andere Deutungsmöglichkeit dieser Befunde auszuschließen, daß nämlich der Puff trotz Gegenwart von Ecdyson sich wieder rückbilde. Leider gibt es keine Möglichkeit, den Ecdysongehalt der Hämolymphe direkt zu bestimmen, man ist daher auf indirekte Schlüsse aus dem Verhalten des Puffs angewiesen. In der Normalentwicklung wird der Puff während der ganzen Vorpuppenphase nicht wieder rückgebildet, und es wurden auch sonst keine Entwicklungsphasen gefunden, in denen Ecdyson im Tier vorhanden ist, der Puff aber fehlt. Immerhin könnte man daran denken, daß andere für die Aktivität dieses Gens notwendige Faktoren vorhanden sein müßten, die bei der experimentell ausgelösten Entwicklung nicht hinreichend zur Verfügung stünden, was dann hier die baldige Rückbildung zur Folge hätte. Das ist aber dadurch ausgeschlossen, daß die Erhöhung der Ecdysondosis — die ja außerdem die Genaktivität erhöht — die Verlängerung der Aktivitätsdauer bewirkt. Der *Mangelfaktor bei der Puffrückbildung ist in diesen Versuchen also sicher das Ecdyson. Das Gen im Abschnitt I-18-C bleibt nur solange aktiv, wie Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist.*

Auf das Ecdyson bezogen bedeuten die Befunde, daß seine Konzentration schnell wieder sinkt, und um so schneller wieder einen sehr niedrigen Stand erreicht, je weniger Ecdyson injiziert wurde. Die Hormonkonzentration sinkt jedenfalls bis unter ein Niveau, das zur Puffinduktion nötig ist. Das Absinken der Konzentration geht allmählich entsprechend dem langsamen Rückgang der Puffgröße vor sich. Die Kurven I und II in Abb. 9 spiegeln daher zugleich auch die *zeitlichen Veränderungen der Hormonkonzentration in der Hämolymphe* wider.

Es gibt keine Hinweise dafür, in welcher Weise die Erniedrigung der Hormonkonzentration bewirkt wird. Man kann an Ausscheidung, an Inaktivierung, aber auch an Verbrauch bei der Häutungsinduktion denken. Daß es der Verbrauch allein ist, ist zumindest unwahrscheinlich. Jedenfalls verschwindet das Hormon in der Normalentwicklung gerade noch nach Beendigung der Häutungs- bzw. Metamorphosevorgänge aus der Hämolymphe. Für das Hormon der *Corpora allata* ist nachgewiesen, daß es im Kot ausgeschieden wird (KARLSON und SCHMIALEK 1959). Aus der Hormonphysiologie der Wirbeltiere ist bekannt, daß injizierte, reine Hormone ziemlich schnell an Wirksamkeit verlieren, und zwar läßt sich durch Erhöhung der Dosis weder die Wirksamkeit noch die Wirkungsdauer beliebig steigern. Auch hier muß also eine Inaktivierung oder Ausscheidung erfolgen.

Über die zeitlichen Beziehungen, die zwischen Abnahme der Ecdysonkonzentration und der ihr folgenden Größenveränderung des Puffs

bestehen, kann man auf Grund des geringen zur Verfügung stehenden Zeitraumes schließen, daß der Puff auf eine Verringerung der Konzentration wie auf ihre Erhöhung ziemlich schnell reagiert.

Das Verhalten des Puffs nach Injektion von 45 CE Ecdyson stimmt nach 24stündiger Einwirkungsdauer grundsätzlich mit den Ergebnissen nach Injektion kleinerer Dosen überein: auch hier nimmt die Puffgröße ab, und zwar, wiederum entsprechend der weiteren Konzentrationserhöhung, weniger als nach Injektion von 15 CE. Die Besetzung der Puffgrößeklassen nach Injektion der drei verschiedenen hohen Dosen Ecdyson zeigt nach 24 Std also das gleiche Bild wie nach 2–8 Std, die Häufigkeitsmaxima sind nur jeweils nach den kleineren Klassen hin verschoben (Abb. 8a und b).

Nach längerer Einwirkungsdauer des Ecdysons (Abb. 8c und d) verhält sich der Puff dagegen bei einer Dosis von 45 CE ganz anders, als wir es bisher aus den Versuchen mit kleineren Dosen kennen. Das wird besonders deutlich, wenn man die Durchschnittsgrößen, welche die Puffs unter verschiedenen Versuchsbedingungen erreichen, kurvenmäßig darstellt.

Zur Berechnung der Durchschnittsgrößen wurden die Puffgrößen in Größeneinheiten ausgedrückt, die den Größenklassen entsprechen. Die Summe der Einzelwerte eines Versuchs (Einzeldiagramm in Abb. 8) ist angegeben in Prozenten des Maximalwertes, den die Gruppe Versuchstiere erreicht hätte, wenn der Puff in allen Tieren die Größe 3 besäße. Als Beispiel sei die Berechnung für das Diagramm  $a_1$  der Abb. 8 hier durchgeführt: Klasse 0: 0 Tiere = 0 Einheiten, Klasse 1: 8 Tiere = 8 E, Klasse 2: 14 Tiere = 28 E, Klasse 3: 7 Tiere = 21 E. Insgesamt 57 E bei 29 Tieren. Der Maximalwert wäre gewesen  $29 \times 3 = 87$ .  $57 = 65,5\%$  von 87; 65,5% ist die in diesem Versuch erreichte Puffgröße.

Die Angabe der Puffgröße in Prozenten des maximal erreichbaren Wertes ist weniger anschaulich als etwa der arithmetische Mittelwert; der Wert von 50% in unserer Bezeichnung entspricht einer mittleren Größe von 1,5 E. Sie hat aber den Vorteil, daß man ohne Rücksicht auf die ungleichen Größeneinheiten die Kurven für verschiedene Puffs unmittelbar vergleichen kann. Davon wird später noch Gebrauch gemacht.

Für die Berechnung wurden sämtliche Werte der Abb. 8 verwendet, obwohl z. B. nach Injektion von 10 CE die induzierten Puffs nach 24 Std wahrscheinlich wieder vollständig rückgebildet sind und das eine in Klasse 3 eingetragene Tier (Abb. 8 b<sub>1</sub>) sich unabhängig vom Versuch in Metamorphose befindet (s. S. 622), andererseits die negativen Werte nur in den Diagrammen b<sub>1</sub> und c<sub>1</sub> im Versuch selbst begründet sind. Beide Fehler verkleinern aber nur den hier zu beschreibenden Effekt. Wenn die so erhaltenen Werte im einzelnen auch keineswegs exakt sind, zumal das Zahlenmaterial zum Teil klein ist, so geben die Kurven doch insgesamt ein richtiges Bild der zeitlichen Änderungen der Puffgrößen. Mehr sollen sie nicht; auf Einzelheiten, wie das leichte Ansteigen der Kurve III nach 24 Std, wird kein Wert gelegt.



In Abb. 9 sind die durchschnittlichen Puffgrößen bei verschiedenem Abstand von der Injektion eingetragen und die Werte der Versuchsgruppen, denen gleiche Dosen Ecdyson injiziert worden waren, zu Kurven verbunden. Die Kurven I und II zeigen zunächst wieder besonders deutlich die schon beschriebene fortlaufende Verkleinerung des Puffs I-18-C nach längerer Versuchszeit und Injektion kleinerer Dosen Ecdyson.

Die Kurve III (45 CE Ecdyson) läuft im Abschnitt bis 24 Std den beiden anderen parallel, dann jedoch macht sie einen Knick und zeigt an, daß der Puff sich nun nicht weiter verkleinert, wie es nach dem bisherigen Ergebnis zu erwarten gewesen wäre, sondern mindestens die dann erreichte Größe beibehält. Die Reaktion nach Injektion von 45 CE Ecdyson ist also nicht nur quantitativ, sondern qualitativ verschieden von der nach Injektion geringerer Dosen.

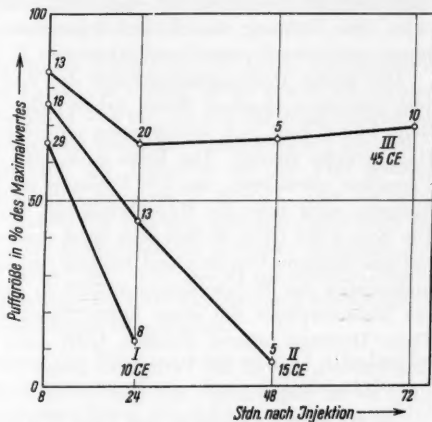


Abb. 9. Zeitliche Veränderungen der Größe des induzierten Puffs I-18-C nach Injektion von 10, 15 oder 45 CE Ecdyson. Die Ziffern geben die Anzahl Tiere an, aus denen die eingetragenen Durchschnittswerte gewonnen wurden. Zur Berechnung der Durchschnittsgröße s. Text

Für die Versuche mit 48 und 72 Std Einwirkungsdauer sind insgesamt bisher über 50 Tiere injiziert worden; die Verluste sind bei längerer Einwirkungsdauer recht groß. Die Puffmuster der erhaltenen Präparate stimmen jedoch außerordentlich gut überein, obwohl zu diesen Versuchen Tiere aus insgesamt sechs Tochterkulturen verwendet worden waren. An der Realität des Unterschiedes im Puffverhalten, der in den Kurven der Abb. 9 zum Ausdruck kommt, ist also trotz des relativ geringen Zahlenmaterials nicht zu zweifeln.

Möglicherweise wird der Puff nach 24 Std sogar wieder größer. Der subjektive Eindruck spricht dafür. Während zahlreiche der in Klasse 2 eingeordneten Präparate nach 24 Std Einwirkungsdauer nur gerade noch zur Klasse 2 gerechnet wurden, erreichten die meisten der nach 48, und vor allem nach 72 Std fixierten beinahe die Klasse 3. Mit der gewählten Methode lassen sich aber solche Unterschiede nicht sicher erfassen<sup>1</sup>.

Wenn der Hormontiter in der Hämolymphe in ähnlicher Weise, wie wir es oben nach Injektion kleinerer Dosen fanden, vielleicht etwas langsamer, auch in diesen Versuchen wieder sinkt, dann bedeutet der Befund,

<sup>1</sup> Siehe Fußnote S. 663.

daß die Puffgröße über 24 Std hinaus nicht weiter abnimmt und daß auch 3 Tage nach der Injektion noch ein großer Puff vorhanden ist, daß der Puff I-18-C in diesem Fall länger aktiv bleibt als Ecdyson vorhanden ist. Dem widersprechen aber alle bisher dargestellten Ergebnisse, und auch in der Normalentwicklung ließen sich keine Phasen nachweisen, in denen Ecdyson sicher fehlt und trotzdem der Puff I-18-C ausgebildet ist. Wenn sie sich auch noch nicht ganz ausschließen läßt, so ist diese Deutung danach doch sehr unwahrscheinlich. Wir werden darauf später noch einmal zurückkommen (s. S. 639).

Die zweite Deutungsmöglichkeit der Kurve III (Abb. 9), die auf dem bisherigen Ergebnis dieser Arbeit fußt, ist, daß die Aktivität des Gens I-18-C auch hier wieder einen relativ hohen Ecdysontiter in der Hämolymphe anzeigt. Das heißt dann, daß der Hormontiter in diesen Versuchen abweichend, von dem Verhalten nach Injektion kleiner Dosen Ecdyson, nicht unter ein Maß absinkt, das nach etwa 24 Std erreicht ist. Die Kurve III (Abb. 9) läßt sich dann ebenso wie die beiden anderen auf das Ecdyson beziehen und spiegelt den zeitlichen Verlauf der Veränderungen der Ecdysonkonzentration in den Tieren wider, in denen die Metamorphose mit einer hohen Dosis Ecdyson induziert wurde. Diese Deutung unserer Befunde trifft nach allen unseren bisherigen Ergebnissen, sowohl des Verhaltens dieses Puffs in der Normalentwicklung als im Experiment, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu.

Zu erklären bleibt dann, wieso der Ecdysongehalt der Hämolymphe nicht über 24 Std hinaus abnimmt. Hypothesen, die auf einer Veränderung der Abnahme des injizierten Ecdysons basieren, haben wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Dagegen könnte man die Befunde sehr gut erklären, wenn man in Anlehnung an WILLIAMS (1952) annimmt, daß durch die Injektion der hohen Dosis Ecdyson die Hormonproduktion der Prothoraxdrüse in Gang gebracht ist und durch das Auftreten des eigenen Ecdysons der Konzentrationsabfall des injizierten ausgeglichen wird. Die Kurve III in Abb. 9 würde sich dann — als Ecdysonkonzentrationskurve aufgefaßt — aus zwei Teilkurven zusammensetzen, einer parallel den Kurven für die niedrigen Dosen abfallenden und einer ansteigenden. Auf eine solche Stimulation der Prothoraxdrüsen durch Ecdyson schloß WILLIAMS (1952) bereits auf Grund seiner Versuche an *Platysamia*, in denen er an enthirnten, in Parabiose zu Ketten vereinigten Puppen durch Implantation eines Gehirns in die erste Puppe der Kette in allen Gliedern Entwicklung auslösen konnte. Ob diese Hypothese der Selbststimulation der Prothoraxdrüsen zutrifft, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden. In unserem Fall läßt sie sich jedoch experimentell prüfen. Bestätigt sie sich, so wäre damit zugleich die ihr hier zugrunde liegende Hypothese bewiesen, daß die Aktivität des Gens I-18-C auch in diesen Versuchen auf der Anwesenheit von Ecdyson beruht. Die Versuche sind eingeleitet.

Trifft die Hypothese der Stimulation der Prothoraxdrüsen zu, so sagt sie aus, daß auch für die Prothoraxdrüsen das Häutungsverhalten durch Ecdyson ausgelöst werden kann. Es ist daher von Bedeutung, daß erst durch Injektion von 45 CE Ecdyson in unseren Versuchen die Metamorphose tatsächlich vollständig, oder zu mindest sehr weitgehend, ausgelöst wurde (s. S. 663). Der von den beiden anderen abweichende Verlauf der Kurve III in Abb. 9 findet also im Entwicklungsverhalten des ganzen Tieres seine Parallele.

Vergleicht man die Größe des Puffs I-18-C in diesen Versuchstieren mit der in unbehandelten Larven, so entspricht sie sowohl 48 als auch 72 Std nach der Injektion der in — dem Zustand der Imaginalscheiben und des übrigen Puffmusters nach beurteilt — physiologisch gleichalten Vorpuppen. Unmittelbar nach der Injektion ist der Puff dagegen größer als in jungen normalen Vorpuppen (s. S. 621). Das Verhalten des Puffs nach Injektion von 45 CE Ecdyson läßt sich daher auch beschreiben als *Einspielen in die Verhältnisse der normalen Metamorphose*. Das erfolgt bei geringerer Dosis nicht. Auch das ist am verständlichsten mit der Annahme einer Steuerung der Entwicklung durch körpereigenes Hormon nach ihrer experimentellen Stimulierung.

Das Ecdyson als Hormon der Häutungsauflösung ist offenbar bei allen Insekten dasselbe, es ist artunspezifisch. Seine Aufgabe ist überall, den über die neurosekretorischen Zellen des Gehirns gegebenen Anstoß zur Häutung an die verschiedenen Gewebe bzw. Zellen weiterzugeben. Die auszulösenden Vorgänge in den verschiedenen Geweben und bei den verschiedenen Arten sind im einzelnen art- und gewebespezifisch. Es spricht jedoch einiges dafür, daß das Hormon nicht unmittelbar die jeweils spezifischen Prozesse auslöst, sondern daß es zunächst eine gewebeunspezifische Primärreaktion bewirkt (CLEVER 1961a). Auf jeden Fall ist aber anzunehmen, daß ein ausgelöster Prozeß der Primärwirkung des Hormons umso näher steht, je spezifischer er für das Hormon und je allgemeiner er in den betroffenen Organen verbreitet ist. Daß die Reaktion des Gens I-18-C nicht gewebespezifisch ist, wurde bereits kurz mitgeteilt (CLEVER 1961a). Hier sei noch über einen Befund berichtet, welcher zeigt, daß diese Ecdyson-abhängige Puffbildung auch kein Sonderfall von *Chironomus tentans* ist.

Einige der *Injektionsversuche* wurden an *Bastardlarven* der nahe verwandten Arten *C. tentans* und *C. pallidivittatus*, die fertil kreuzbar sind, durchgeführt. Das Querscheibenmuster der Riesenchromosomen beider Arten ist weitgehend homologisierbar, der Hauptunterschied besteht in einigen artspezifischen Inversionen (s. BEERMANN 1955). Der rechte Arm des I. Chromosoms stimmt in der Reihenfolge der Querscheiben bei beiden Arten soweit überein, daß es zu fast normaler Paarung ohne Schleifenbildung kommt. Kleine Paarungslücken zeigen aber auch hier

an, wenn man ein Bastardchromosom vor sich hat. In solchen Bastardchromosomen wird an genau der gleichen Stelle im Abschnitt I-18-C in beiden Einzelchromosomen durch Ecdyson ein Puff derselben Stärke induziert (Abb. 10). Es wäre interessant zu wissen, ob sich ein gleichreagierendes Gen auch bei weiter entfernten Arten nachweisen läßt. Nebenbei ist durch diesen Befund zum erstenmal gezeigt, daß an homologen Stellen artverschiedener Chromosomen im physiologischen Experiment gleichreagierende Gene liegen.

In den einleitenden Abschnitten überlegten wir, ob die unterschiedliche Größe der Puffs verschiedener Tiere nicht lediglich Ausdruck

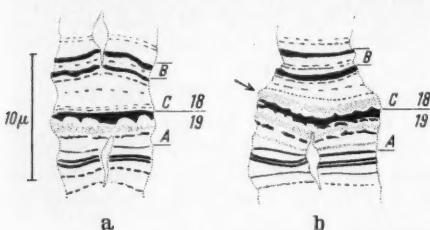


Abb. 10 a u. b. Induktion des Puffs I-18-C in einem Bastardchromosom *Chironomus tentans*  $\times$  *pallidivittatus*. a Unbehandelte Kontroll-Larve, b 5 Std nach der Injektion von 10 CE Ecdyson

dafür sei, daß man sie in zeitlich verschiedenen Phasen ihrer Entwicklung getroffen hätte. Daß es nicht so ist, ist durch die geschilderten Ergebnisse hinreichend gesichert, da sich ganz konkrete Aussagen über die Zeitdauer des „puffing“ unter den verschiedenen Bedingungen machen ließen.

Die Aktivitätsdauer eines Gens, die sich in der Ausbildung eines Puffs ausdrückt, unterliegt der Kontrolle durch Plasma-Faktoren, hier dem Vorhandensein des Ecdysons bzw. von Faktoren, die von seiner Anwesenheit abhängig sind. Das mag bei Tieren mit sehr konstanter Entwicklungsgeschwindigkeit dazu führen, daß die Zeitdauer des „puffing“ einer Querscheibe bei verschiedenen Tieren ziemlich gleich ist, wie es in den Untersuchungen BECKERS (1959) an *Drosophila* zum Ausdruck kommt. Diese Frage wird noch weiter diskutiert werden, wenn dafür auch noch die Ergebnisse der Untersuchung der Normalentwicklung von *C. tentans* zur Verfügung stehen (s. Teil II).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber nun weiter, daß nicht nur die Aktivitätsdauer eines Gens, die Dauer des Vorhandenseins eines Puffs, vom Plasma her reguliert wird, sondern auch die Größe des Puffs. Die Frage ist, wieweit man aus unterschiedlichen Puffgrößen auf Aktivitätsunterschiede der Gene schließen darf.

Für diese Überlegung muß man streng unterscheiden, ob man die Größen verschiedener Puffs vergleicht oder unterschiedliche Größenzustände der homologen Puffs in verschiedenen Tieren. Die Maximalgrößen, die verschiedene Puffs in der Normalentwicklung erreichen, unterscheiden sich stark. MECHTELKE (1959) meint, daß die Menge der

DNS einer Querscheibe der die Größe des Puffs begrenzende Faktor sei. Unterschiede der maximalen Puffgröße können bedeuten, daß auch der Aktivitätsgrad, den die einzelnen Gene erreichen können, verschieden ist; denkbar wären aber auch ganz andere Gründe, etwa Strukturunterschiede der verschiedenen Loci oder Unterschiede in der Geschwindigkeit des Abwanderns der Genprodukte. Aus Größenunterschieden nicht homologer Puffs läßt sich jedenfalls noch nicht ohne weiteres auf Aktivitätsunterschiede schließen.

Anders ist es jedoch für *unterschiedliche Größenzustände der homologen Puffs in verschiedenen Tieren*. Die Möglichkeit, daß es sich hierbei um Entwicklungszustände der Puffstruktur handelt, ließ sich in dem hier untersuchten Fall ausschließen bzw. auf bestimmte Zeiträume beschränken. Aus der positiven Korrelation der Größe des Puffs I-18-C und der Konzentration des regulierenden Faktors ist vielmehr zu schließen, daß seine unterschiedlichen Größenzustände Anzeichen für Aktivitätsunterschiede der puffbildenden Gene sind. *Nicht nur, ob ein Genlocus überhaupt aktiv ist, wird von Plasmafaktoren reguliert, sondern auch die jeweilige Intensität seiner Aktivität.*

Zu dem Schluß, daß die Puffgröße ein Maß für die Genaktivität sei, kommt BEERMANN (1959) auch auf Grund seiner vergleichenden Analyse der Größe homologer Puffs in verschiedenen Geweben.

Kennt man den maximalen Ausbildungszustand eines Puffs, dann läßt sich seine jeweilige Aktivität als Relation der aktuellen Größe zur maximalen Größe erfassen. Solche relativen Aktivitäten sind auch für die gleichzeitig vorhandenen Puffs verschiedener Loci vergleichbar. Für die Zwecke dieser Arbeit genügt es, Puffgrößen in dieser Form als Aktivitätsmaße zu betrachten.

Für die Frage nach der Beziehung zwischen Häutungseinleitung durch das Ecdyson und die beobachteten Wirkungen auf das Gen im Abschnitt I-18-C sind die folgenden Befunde von besonderer Bedeutung:

1. Es handelt sich bei dieser Genaktivität um eine für Entwicklungsphasen, in denen Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist, spezifische Reaktion.

2. Die Aktivierung erfolgt innerhalb außerordentlich kurzer Zeit nach der Erhöhung der Ecdysonkonzentration.

3. Die Genaktivität wird ständig vom Ecdysontiter reguliert.

4. Homologe Gene in anderen Geweben und auch in der Speicheldrüse der verwandten Art *C. pallidivittatus* zeigen das gleiche Verhalten gegenüber Ecdyson.

Hieraus ist zu schließen, daß einem in Abschnitt I-18-C gelegenen Gen in dem durch das Ecdyson ausgelösten Häutungsgeschehen eine wesentliche Bedeutung zukommt. Grundsätzlich zu unterscheiden sind zwei Möglichkeiten: Vom Ecdyson wird zunächst eine einzige Reaktions-

kette in Gang gesetzt, in der diese Genreaktion ein Glied ist; alle späteren Reaktionen müßten dann kausal mit dieser Genreaktion zusammenhängen. Oder aber diese Genreaktion ist nur Glied in einer von mehreren voneinander unabhängigen, direkt oder indirekt durch das Ecdyson in Gang gesetzten Reaktionsketten; andere eventuell zu beobachtende Effekte des Ecdysons könnten dann unabhängig vom vorherigen Ablauf der Puffbildung im Abschnitt I-18-C erfolgen. Im Sinne dieser Alternative wird bei den nunmehr zu beschreibenden Wirkungen des Ecdysons auf andere Gene gefragt werden, 1. welche Beziehungen bestehen zum Ecdyson, 2. sind diese Genreaktionen abhängig von der gleichzeitigen oder vorherigen Puffbildung im Abschnitt I-18-C?

## 2. Der Puff IV-2-B

Die meisten Ähnlichkeiten im Verhalten gegenüber Ecdyson mit dem soeben beschriebenen Gen zeigt ein anderes, das im Abschnitt 2-B des kleinen IV. Chromosoms in der Nähe des Balbiani-Ringes Br<sub>1</sub> liegt. Abb. 11a zeigt diese Chromosomenregion aus einer unbehandelten Kontrollarve, Abb. 11b zeigt sie aus einer Larve nach Injektion von Ecdyson.

Die Nähe des Balbiani-Ringes erschwert die *genaue Lokalisation* dieses Puffs. Die Grenze der Abschnitte 2-A und 2-B des IV. Chromosoms wird von einer recht dicken Querscheibe gebildet (vgl. Abb. 12). An sie schließt sich im Abschnitt 2-B zunächst ein querscheibenfreies Stück an, das von einer dünneren, aber deutlichen Scheibe abgeschlossen wird. Auf sie folgt eine gewöhnlich etwas diffus erscheinende Zone, in welcher bei der hier angewendeten Färbetechnik nur gelegentlich und nur undeutlich Querscheiben erkennbar sind. Der Puff entsteht in dieser Zone, sehr dicht an der noch deutlichen, in Abb. 12a mit Pfeil bezeichneten Querscheibe. Gewöhnlich ist diese Querscheibe in den Puff einbezogen und damit bei seiner stärkeren Ausbildung unsichtbar. Daß aber nicht sie den Puff bildet, lassen manche Präparate (s. z.B. Abb. 12b) deutlich erkennen. Der Puff bzw. das puffbildende Gen wird in dieser Arbeit mit dem Symbol IV-2-B bezeichnet.

Auch der Puff IV-2-B gehört zu denen, bei denen eine einmal eingestellte Größe über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben kann. Nach den Überlegungen und Ergebnissen des vorigen Kapitels kann man in solchen Fällen die *Puffgröße als Maßstab für die unter verschiedenen Bedingungen erreichte Genaktivität* verwenden. Die Größe des Puffs wurde daher wieder nach *Größenklassen* beurteilt, die folgendermaßen definiert wurden:

*Größenklasse 0:* Die Beurteilung schwacher Ausbildungsstufen des Puffs ist häufig durch den Balbiani-Ring erschwert. Die Größe gerade dieses Balbiani-Ringes kann sehr stark wechseln; so klein wie in Abb. 12d

ist er nur sehr selten. Gewöhnlich ragen vielmehr die mit intensiv grün gefärbtem Protein gefüllten Schleif r bis zum Puff und verdecken ihn (vgl. Abb. 11b). Neben Präparate, in denen sicher ein kleiner Puff vorhanden ist, gibt es daher eine größere Anzahl, in denen dies zwar

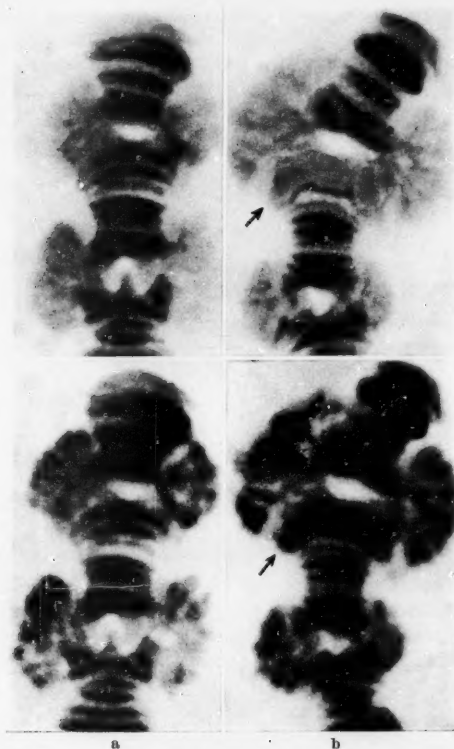


Abb. 11a u. b. IV. Chromosom, oben mit Grünfilter, unten mit Rotfilter photographiert. a Unbehandelte Kontrolle, b nach der Injektion von Ecdyson; der induzierte Puff IV-2-B ist mit Pfeil markiert. Vergr. etwa 1700  $\times$

wahrscheinlich, eine sichere Beurteilung aber nicht möglich ist. Diese Fälle und natürlich die relativ seltenen, in denen zweifelsfrei kein Puff ausgebildet ist, d.h. die Querscheiben im Abschnitt 2-B deutlich normale Ruhestuktur zeigen (Abb. 12a), werden in dieser Arbeit sämtlich als negativ gewertet. Der als negativ (Klasse 0) angegebene Prozentsatz



ist daher sicher zu hoch. — Die Beurteilung größerer Puffs ist stets einwandfrei möglich.

**Größenklasse 1** (Abb. 12b): Eine schmale grüne Zone neben der mit Pfeil bezeichneten Querscheibe. Die Querscheibe ist meistens in den Puff einbezogen und dann nicht mehr erkennbar.

**Größenklasse 2** (Abb. 12c): Die diffuse, grün gefärbte Zone hat sich verbreitert und umfaßt einen Teil des schon im Normalzustand etwas diffus erscheinenden Bereichs. Noch keine Veränderung des Chromosomenumrisses.

**Größenklasse 3** (Abb. 12d): Der Bereich ist stark aufgebläht, die Chromosomenstruktur blasig aufgelockert, das Chromosom an dieser

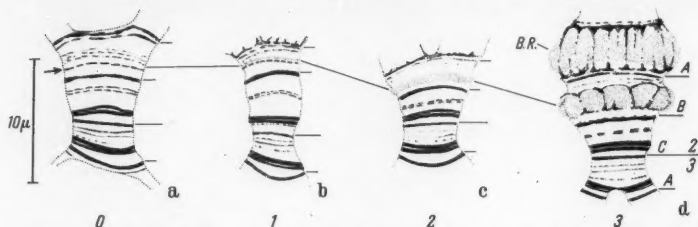


Abb. 12a—d. Verschiedene Ausbildungsstufen des Puffs IV-2-B. Typische Beispiele für Puffs der verschiedenen Größenklassen (Ziffern unter den Chromosomen). a und b aus unbehandelten Kontrollen, c und d aus Larven, denen Ecdyson injiziert worden war. B.R. in d der Balbiani-Ring Br., der hier nur sehr schwach ausgebildet ist

Stelle verbreitert. Die aufgelockerte Zone ist mit intensiv grün gefärbtem Protein gefüllt.

In den *Kontrollen* ist der Puff im Abschnitt IV-2-B bereits bei einem großen Teil der Tiere vorhanden (Abb. 13). Er ist in diesen Tieren allerdings meistens klein, in nur 10% von ihnen gehört er zur Größenklasse 2. Das eine in der Abb. 13 verzeichnete Kontrolltier, das den Puff in der Größe 3 besitzt, zeigte auch den Puff I-18-C in der Größe 2; es handelt sich also bereits um eine Vorpuppe.

Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Puffgrößen in den Kontrollen entspricht den Befunden der *Untersuchung der Normalentwicklung*. Diese ergab: Das puffbildende Gen im Abschnitt IV-2-B kann auch in jungen Larven in wechselnden Graden schwach aktiv sein. Beziehungen zwischen solchen Aktivitätsgraden des Gens und bestimmten Entwicklungszuständen des Tieres waren nicht erkennbar. Sehr stark aktiv ist das Gen ausschließlich in jungen Vorpuppen und in anderen Häutungsphasen, allerdings erfolgt die Aktivierung später als die des Gens I-18-C. Die erhöhte Aktivität erlischt häufig in der Mitte oder gegen Ende der Vorpuppenphase. *Tätigkeit dieses Gens überhaupt* ist also *entwicklungsunspezifisch, entwicklungs-*

spezifisch ist dagegen sein *sehr hoher Aktivitätsgrad* (s. Teil II für genaue Analyse).

Nach Injektion von Ecdyson ist das Häufigkeitsmaximum völlig zugunsten der höheren Größenklassen verschoben (Abb. 13). Das heißt also, Ecdyson bewirkt, unabhängig vom Zustand des Puffs bei der Injektion, die starke Aktivierung dieses Gens. Deutlicher noch als in der Abbildung, in der dem Kontrollmaterial das gesamte Versuchsmaterial gegenübergestellt ist, wird die außerordentlich starke und gleichmäßige Aktivierung, wenn man nur den Teil des Versuchsmaterials betrachtet, der während der stärksten Ausbildung des Puffs fixiert wurde (s. S. 634). Dann gehören fast 90% der Größenklasse 3 an. Die Situation ist gerade umgekehrt wie bei dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Puff. Während dort einem wenig streuenden Ausgangsmaterial ein breit streuendes Versuchsmaterial gegenüberstand (s. Abb. 5), streut hier das Ausgangsmaterial relativ breit, während der induzierte Zustand bei allen Tieren recht einheitlich ist.

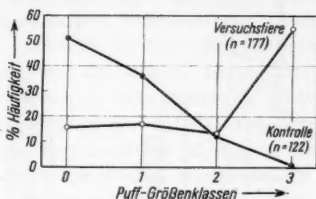


Abb. 13. Häufigkeiten der verschiedenen Größenklassen des Puffs IV-2-B in den Kontrollen und im Gesamtmaterial nach der Injektion von Ecdyson

Um die Bedingungen kennenzulernen, unter denen die Aktivierung des Gens IV-2-B durch das Ecdyson erfolgt, soll das Gesamtmaterial der Versuche nun wieder nach den verschiedenen Versuchsbedingungen aufgeschlüsselt werden. Wir werden dabei ganz entsprechend dem im vorigen Kapitel auf den Puff I-18-C angewandten Verfahren vorgehen, so daß für die einzelnen Überlegungen auf das dort Gesagte verwiesen sei.

Da die ganze Untersuchung zunächst von der des Puffs I-18-C ausging, dessen Bedeutung zuerst erkannt wurde und dessen Verhalten bei Auswertungen während des Ganges der Untersuchungen auch für neue Experimente als Leitmarke diente, sind es hier im wesentlichen wieder dieselben Tiere, die zur Auswertung zur Verfügung stehen. Die Anzahl ist allerdings etwas geringer, da sich wegen starker Heterozygotie des 4. Chromosoms die Tiere der ersten Versuche nicht alle auswerten ließen.

Zunächst entscheidend ist auch hier wieder die Frage nach dem *zeitlichen Verlauf der Aktivierung* durch das Ecdyson.

Der *Beginn der Reaktion* läßt sich hier schwieriger als bei dem zuvor beschriebenen Puff angeben, weil ein kleiner Puff im allgemeinen bereits vor der Injektion vorhanden ist, man aber den genauen Ausgangszustand im einzelnen Versuchstier nicht kennt. Nach dem Vergleich der Klassenhäufigkeiten zu urteilen (s. Abb. 14), hat 30 min nach der Injektion noch keinerlei Reaktion eingesetzt. Das entspricht auch dem unmittelbaren Eindruck bei der Durchsicht der Präparate. Soweit

Puffs vorhanden sind, gehören sie der kleinsten Klasse an. Dem kleinen Unterschied gegenüber der Gesamtkontrolle im Anteil der Klasse 0 kann bei dem geringen Versuchsmaterial keinerlei Bedeutung beigegeben werden. Im speziell zu diesen Versuchen verarbeiteten Kontrollmaterial gehörten von 16 Tieren sogar 11 der Klasse 1 an, die übrigen der Klasse 0.

Deutlich eingesetzt hat die Puffentwicklung 1 Std nach der Injektion; fast die Hälfte (8 von 18) der Tiere besitzt nun den Puff in der Größe 2 (Abb. 14). Der Vergleich mit den nach 2—8 Std fixierten Tieren zeigt

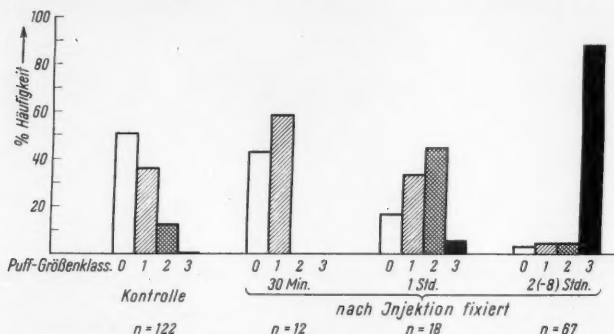


Abb. 14. Häufigkeiten der verschiedenen Größenklassen des Puffs IV-2-B bei den Tieren, die in den ersten Stunden nach der Injektion des Ecdysons fixiert wurden

jedoch, daß die Vergrößerung noch längst nicht ihr Maximum erreicht hat. Auch 2 Std nach der Injektion scheint die Vergrößerung noch nicht immer ganz abgeschlossen zu sein, obwohl die Puffs der dann fixierten Tiere fast ausschließlich (23 von 28) der Klasse 3 zugerechnet wurden. Dem Eindruck bei der Beobachtung nach scheinen sie dann aber im Durchschnitt noch etwas kleiner zu sein als später. Zu den größten überhaupt gefundenen Puffs gehören jedoch sowohl solche aus nach 4, als auch solche aus nach 8 Std fixierten Tieren. Die zwischen 2 und 8 Std nach der Injektion fixierten Tiere wurden wieder zu einer Versuchsgruppe zusammengefaßt.

Nach diesen Befunden beginnt die Puffaktivierung also zwischen 30 und 60 min nach der Injektion und dauert bis über die 2. Std danach hinaus an. Sie beginnt und endet damit jeweils etwas später als die Aktivierung des Puffs I-18-C; die Dauer vom Beginn der Aktivierung bis zum Erreichen der Endgröße scheint in beiden Fällen ähnlich zu sein und zwischen 1 und 2 Std zu betragen.

Die Puffs fast aller nach 2—8 Std fixierten Tiere gehören zur Klasse 3 (s. Abb. 14, rechtes Diagramm). Die Tiere, die noch der Klasse 2

angehören, waren sämtlich nach 2 Std fixiert; bei ihnen könnte die Puffentwicklung noch nicht abgeschlossen sein. Der kleine Rest von 7,5% (5 Tiere) in den Klassen 1 und 2 dagegen hat eindeutig nicht reagiert. Die interessante Frage, um was für Tiere es sich hier handeln könnte, soll bis zur Diskussion der eventuell bestehenden Beziehungen zwischen den Reaktionen der Gene IV-2-B und I-18-C zurückgestellt werden (s. S. 641).

Das Gen IV-2-B wird in etwa 50% der untersuchten Tiere aus einem bereits aktiven Zustand heraus weiter aktiviert; seine Aktivität wird also nur erhöht. Daraus folgt, daß auch die in dieser Puffbildung zum Ausdruck kommende Genreaktion keine Alles-oder-Nichts-Reaktion ist, sondern in ihrer *Intensität von Plasmafaktoren beeinflusst* wird. Nun wurde aber zur Abb. 14 das gesamte, innerhalb der dort dargestellten Zeiten fixierte Versuchsmaterial verwendet, also sowohl Larven verschiedenen Alters, als auch vor allem Larven, denen verschieden große Dosen Ecdyson injiziert worden waren (nämlich 5—45 CE). Mit allen Dosen wird, wie dann aus der Abbildung zu entnehmen ist, bereits die maximale Puffbildung induziert. Die *unterschiedlichen Hormonkonzentrationen* in der Hämolymphe hatten also *in diesen Versuchen keinen Einfluß auf die Intensität der Genaktivität*.

Der Befund könnte bedeuten, daß dieses Gen in den Fällen, in denen seine Aktivität überhaupt durch Ecdyson bewirkt wird, tatsächlich immer auf seine maximale Aktivitätsstufe gebracht wird. Dagegen spricht aber, daß der Puff in jüngeren Vorpuppen häufig nicht seine Maximalgröße hat, obwohl er auch hier gegenüber dem Zustand vor dem Beginn der Metamorphose deutlich vergrößert, also durch Ecdyson aktiviert worden ist. Allerdings ist seine Größenvariabilität in jungen Vorpuppen weniger entwicklungsparallel als die des Puffs I-18-C. Die durchschnittlich geringere Größe des Puffs IV-2-B in jüngeren Vorpuppen im Vergleich zu den Tieren dieser Versuche (2—8 Std nach Injektion) spricht dafür, daß seine *Beeinflussbarkeit in einem Bereich geringerer als der hier erzeugten Ecdysonkonzentration* liegt; seine Maximalgröße wird durch kleinere Ecdysonmengen ausgelöst als die des Puffs I-18-C.

Da in unseren Versuchen kein Einfluß der Dosis auf die induzierte Puffgröße besteht, kann auf eine getrennte Darstellung der mit den verschiedenen Dosen erzielten Ergebnisse für diesen Zeitabschnitt verzichtet werden. Außer dem Einfluß auf die Größe des induzierten Puffs I-18-C fanden wir jedoch dort eine *Abhängigkeit der Aktivitätsdauer von der Höhe der injizierten Dosis*. Besteht diese Abhängigkeit auch für den Puff IV-2-B?

Zur Beurteilung der Puffgrößenhäufigkeiten nach verschiedenem Abstand von der Injektion und nach Injektion verschiedener Dosen wurden wieder die Durchschnittsgrößen, die in den einzelnen Versuchen erreicht wurden, berechnet, wie es

auf S. 624 beschrieben wurde. Wir beschränken uns hier auf die Wiedergabe dieser Durchschnittswerte (Abb. 15). Da sich kein Dosisseffekt auf die induzierte Puffgröße nachweisen ließ, ist hier im Unterschied zu den Kurven für den Puff I-18-C (Abb. 9) als einheitlicher Ausgangswert der aller nach 2–8 Std fixierten Tiere genommen. Dieser Wert wurde über dem Abszissenwert „8 Std“ eingetragen. Da außerdem der Puff IV-2-B bereits im Ausgangsmaterial vorhanden ist, wurde zusätzlich eine Gerade (Abb. 15 unten, Kontrolle) eingetragen, welche die durchschnittliche Puffgröße in den unbehandelten Larven anzeigt.

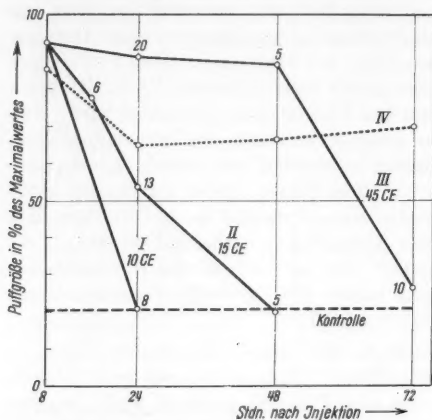


Abb. 15. Zeitliche Veränderungen der Größe des induzierten Puffs IV-2-B nach der Injektion von 10, 15 oder 45 CE Ecdyson. Die Ziffern geben die Anzahl Tiere an, aus denen die eingetragenen Durchschnittswerte gewonnen wurden. Zusätzlich eingetragen ist die durchschnittliche Puffgröße in den Kontrollen und die Kurve aus der Abb. 9, welche die Veränderungen des Puffs I-18-C nach Injektion von 45 CE Ecdyson zeigt (Kurve IV). Den Kurven III und IV liegen dieselben Tiere zugrunde.

Als Ergebnis zeigt Abb. 15, daß nach Injektion von 10 CE die Aktivität nach 24 Std, nach Injektion von 15 CE nach 48 Std wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen ist, während bei höheren Dosen (45 CE) die Aktivitätserhöhung noch länger bestehenbleibt. Wir besprechen zunächst nur die Versuche mit niedrigen Dosen.

Nur bei einem der Tiere, denen 10 CE injiziert worden waren, hat der Puff nach 24 Std noch die Größe 3. Dies ist dasselbe Tier, in dem auch der Puff I-18-C, abweichend von den übrigen dieses Versuchs,

noch besonders groß ist (s. S. 622). Die Vermutung, daß dieses Tier schon vor der Injektion mit der Metamorphose begonnen hatte, wird durch das abnorme Verhalten des Puffs IV-2-B noch gestützt.

Auch die Dauer der induzierten, starken Aktivität des Gens IV-2-B hängt also von der Dosis ab, die injiziert wurde. Die Rückbildung des Puffs I-18-C hatten wir auf einen zeitlich entsprechenden Rückgang der Ecdysonkonzentration in der Hämolymphe zurückgeführt. Aus dem außerordentlich ähnlichen Verlauf der entsprechenden Kurven für die beiden Puffs (Kurven I und II in den Abb. 9 und 15) ließe sich daher bereits schließen, daß auch der Puff IV-2-B seine erhöhte Aktivität nur solange beibehält, wie Ecdyson in der Hämolymphe ist. Derselbe Schluß läßt sich aus dem Verhalten des Gens IV-2-B im Experiment allein ableiten.

Wir konnten die Rückbildung des Puffs I-18-C deshalb auf einen Rückgang der Ecdysonkonzentration beziehen, weil wir die Möglichkeit ausschließen konnten, daß der Puff trotz Gegenwart von Ecdyson rückgebildet werde. Gerade das scheint nun für den Puff IV-2-B in bestimmten Fällen zuzutreffen: im Experiment wird er inaktiv, wenn wahrscheinlich noch Ecdyson vorhanden ist (s. unten), und auch in der Normalentwicklung ist er wahrscheinlich nicht immer, wenn der Ecdysontiter hoch ist, stark aktiv. Nun ist aber die präpupale Aktivitätsdauer des Gens erheblich länger als die mit schwachen Ecdyson Dosen induzierte und gerade auf jene kann auch die induzierte mit steigenden Hormondosen verlängert werden. Für die frühe Rückbildung des Puffs IV-2-B nach Injektion kleiner Hormondosen (Abb. 15, Kurven I und II) muß daher das *Ecdyson* der *Mangelfaktor* sein. Auch das Verhalten des Gens IV-2-B im Experiment für sich betrachtet führt also zu dem Schluß, daß es seine *erhöhte Aktivität nur solange beibehält, wie Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden* ist. Das Abklingen der Aktivität muß dem Rückgang der Hormonkonzentration wieder sehr bald folgen.

Die Rückbildung der beiden Puffs I-18-C und IV-2-B nach der Injektion kleiner Dosen Ecdyson läßt sich also *unabhängig* auf den Rückgang der Ecdysonkonzentration zurückführen; aus dem zeitlichen Verlauf der Rückbildung beider Puffs läßt sich der Verlauf des Rückganges der Ecdysonkonzentration ablesen. Die große Ähnlichkeit der Kurven I und II der Abb. 9 und 15 steht mit dieser Deutung in sehr guter Übereinstimmung.

Wenn die oben (S. 635) geäußerte Vermutung zutrifft, daß die *Stärke der Aktivität des Gens IV-2-B ebenfalls von der Ecdysonkonzentration beeinflusst* wird, aber in einem Bereich geringerer Konzentration als sie in diesen Versuchen durch Injektion erzeugt wurde, dann sollte dieser Bereich beim Verschwinden des Ecdysons durchlaufen werden. Die Rückbildung des Puffs sollte beim Durchlaufen dieses Bereichs allmählich vor sich gehen. Ob das so ist, läßt sich aus den Kurven I und II der Abb. 15, die zwar diesen Eindruck erwecken, noch nicht entnehmen, da die dort eingetragenen Durchschnittswerte ebensogut ausschließlich aus großen und kleinen Klassenwerten zusammengesetzt sein könnten wie aus solchen der mittleren Klassen. Im ersteren Falle müßte man jedoch folgern, daß die Aktivität des Gens sprunghaft wieder auf einen geringen Wert zurückginge, wenn die Hormonkonzentration eine bestimmte Schwelle unterschritte. In Tabelle 1 sind daher die Einzelwerte für den Zeitabschnitt der Rückbildung des Puffs nach Injektion von 15 CE Ecdyson eingetragen. Die Klasse 3 ist hier zwar auch nach 24 Std noch relativ stark besetzt, ebenso schon die niedrigsten Klassen; insgesamt scheint die Zahlenverteilung aber doch mehr auf eine langsame Größenabnahme hinzudeuten, vor allem, wenn man die beiden Altersgruppen

Tabelle 1. Größe des sich rückbildenden Puffs IV-2-B nach Injektion von 15 CE Ecdyson

| Fixiert<br>Std nach<br>Injektion | Anzahl Tiere in Größenklasse |   |   | Durchschnittsgröße in |      | n  |
|----------------------------------|------------------------------|---|---|-----------------------|------|----|
|                                  | 0—1                          | 2 | 3 | Einheit               | %    |    |
| 16                               | 1                            | 2 | 3 | 2,3                   | 77,8 | 6  |
| 24                               | 5                            | 4 | 4 | 1,6                   | 53,9 | 13 |

vergleicht. Das würde dann unsere Vermutung bestätigen. Eine sichere Entscheidung läßt sich darüber allerdings noch nicht fällen.

Die Kurve der Versuchsguppen, denen 45 CE Ecdyson injiziert worden waren (Abb. 15, Kurve III), weicht vor allem dadurch von den beiden bisher besprochenen ab, daß sie bis 48 Std nach der Injektion praktisch unverändert auf derselben Höhe bleibt. Erst danach wird der Puff rückgebildet und hat 72 Std nach der Injektion die Ausgangsgröße wieder erreicht. Die Rückbildung setzt also erst spät ein und geht dann relativ rasch vonstatten.

Der im vorigen Kapitel beschriebene Puff I-18-C reagierte auf 45 CE Ecdyson mit dem vollständigen für die Vorpuppenphase typischen Verhalten; trifft das auch für das soeben beschriebene induzierte Verhalten des Gens IV-2-B zu? Dieses Gen ist nur im ersten Teil der Vorpuppenphase stark aktiv, die durchschnittliche Puffgröße ist dann vielleicht etwas geringer als in den Versuchen. In älteren Vorpuppen ist der Puff häufig klein oder fehlt ganz. Einen streng festgelegten Zeitpunkt, an dem die Inaktivierung in der Entwicklung notwendig erfolgt, scheint es nicht zu geben. Der Puff kann jedoch auch in der Normalentwicklung bereits in Vorpuppen eines Alters fehlen, das — nach dem Zustand der Imaginalscheiben und des übrigen Puffmusters geurteilt — drei Tage nach der Injektion von 45 CE Ecdyson erreicht ist. Mit einer Dosis von 45 CE Ecdyson wird also bei den beiden früh reagierenden Genen I-18-C und IV-2-B das normale Vorpuppenverhalten vollständig ausgelöst.

Die Rückbildung des Puffs IV-2-B zwischen 48 und 72 Std nach der Injektion läßt sich wieder auf zweierlei Weise deuten: entweder geht sie einem entsprechenden Rückgang der Ecdysonkonzentration parallel, oder aber der Puff IV-2-B wird in diesem Falle trotz Gegenwart von Ecdyson inaktiv. Die erste Deutung läge, hätte man nur die Befunde an diesem Puff, zunächst näher. Nach ihr gäbe auch die Kurve III in Abb. 15 zugleich den Rückgang der Ecdysonkonzentration in der Hämolymph wieder, der entsprechend der höheren Dosis langsamer erfolgte als bei den Kurven I und II. Diese Deutung widerspricht aber den Folgerungen, die wir aus dem Verhalten des Puffs I-18-C gezogen hatten. Die Kurve des Verhaltens dieses Puffs, die wir oben (S. 626) zugleich als Kurve des zeitlichen Verlaufs der Veränderungen der



Ecdysonkonzentration gedeutet hatten, ist in Abb. 15 (IV) noch einmal zusätzlich eingezeichnet. Den Kurven III und IV in Abb. 15 liegen dieselben Tiere zugrunde.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Puffs im Experiment entspricht ihrem unterschiedlichen Verhalten in der normalen Vorpuppenentwicklung. Nach dem Verhalten des Gens I-18-C zu schließen, wäre Ecdyson bis zum Ende der Vorpuppenphase vorhanden; nach dem Verhalten des Gens IV-2-B dagegen könnte es, von Tier zu Tier wechselnd, von der Mitte der Vorpuppenphase an auch fehlen.

Die *Alternative*, die sich aus der *Verschiedenheit des Verhaltens der beiden Puffs* ergibt, ist: entweder kann der Puff IV-2-B trotz Gegenwart von Ecdyson inaktiv werden, oder aber der Puff I-18-C kann doch länger aktiv bleiben als Ecdyson in der Hämolymphe ist.

Die Gründe, die dagegen sprechen, daß der Puff I-18-C länger, als Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist, aktiv bleiben kann, haben wir oben (S. 626) ausführlich besprochen.

Aus dem Verhalten der beiden Gene in der normalen Vorpuppenentwicklung läßt sich keine sichere Entscheidung fällen, da es noch kein von ihnen unabhängiges Maß gibt, um den Ecdysongehalt der Hämolymphe zu bestimmen; bei *Platysamia* ist es jedoch nach SCHMIDT und WILLIAMS (1953) während der ganzen Vorpuppenphase in der Hämolymphe vorhanden. Außerdem ist es unwahrscheinlich, daß ein so wichtiger Steuerungsfaktor wie das Ecdyson in ein und demselben Entwicklungsstadium vorhanden sein kann oder nicht, wie es für den Puff IV-2-B zutrifft.

Abgesehen vom Inaktivwerden des Puffs IV-2-B sprechen daher alle Befunde dieser Arbeit dafür, daß die Aktivität des Gens I-18-C von der Gegenwart des Ecdysons abhängt. Die entscheidende Frage jedoch, ob das Gen IV-2-B tatsächlich auch bei Gegenwart von Ecdyson schwach aktiv bleiben kann, läßt sich nur experimentell lösen, und zwar sollte es dann *Phasen geben, in denen sich die Aktivität dieses Gens durch Ecdyson nicht vergrößern* ließe. Solche Phasen müßten die sein, in denen die beiden Puffs sich abweichend verhalten, also alte normale Vorpuppen und „experimentelle“, durch Ecdyson-Injektion erhaltene Vorpuppen drei Tage nach der Injektion. Aus technischen Gründen — einheitlicheres Material, soweit bisher zu sehen — ist das Experiment mit experimentellen Vorpuppen vorzuziehen. Es soll noch durchgeführt werden.

Auch die *Injektion von Ecdyson in alte Vorpuppen*, um das Verhalten des Puffs IV-2-B zu prüfen, wurde noch nicht systematisch durchgeführt. Wenigstens 2 Tiere aus einem ähnlichen Versuch, in dem das Hormon mittelalten Vorpuppen injiziert wurde (s. S. 649), ließen sich jedoch hier verwenden. In diesem Versuch erhielten 13 Vorpuppen eine Hormoninjektion von 15 CE und wurden 3–4 Std später fixiert. Zwei von

ihnen waren (dem Zustand des übrigen Puffmusters nach) älter als es für den Versuch vorgesehen war. Während nun alle anderen den Puff IV-2-B stark ausgebildet hatten, fehlte er bei einer der beiden ganz, bei der anderen war er schwach ausgebildet. Hier ist also offenbar gerade bei den beiden Tieren die Puffinduktion ausgeblieben, bei denen es nach unseren Überlegungen zu erwarten war; bei jüngeren Larven erfolgte sie in über 90% (s. S. 634). Dieser Befund müßte natürlich an größerem Material bestätigt werden, bevor man eine sichere Aussage daraus ableiten darf. Immerhin hat man doch schon einen konkreten Hinweis dafür, daß der Puff IV-2-B trotz Ecdyson fehlen kann.

Mit großer Wahrscheinlichkeit wird der Puff IV-2-B also in unseren Versuchen und auch in der normalen Vorpuppenentwicklung schon rückgebildet, wenn noch Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist. Das wäre verständlich durch die Annahme, daß der Puff in jedem Fall dann rückgebildet wird, die Aktivität des Gens in jedem Falle dann erlischt, wenn es seine Aufgabe, die Abgabe einer bestimmten Information, erfüllt hat. Man könnte hier an eine Art Rückkoppelung denken, entsprechend den bekannten Hemmungen von Enzymsynthesen bei Mikroorganismen, die durch die Endprodukte der Stoffwechselketten, an denen das betroffene Enzym beteiligt ist, ausgeübt werden (s. z. B. GORINI und MAAS 1958).

Nach unserer Hypothese wird also von der Größenkurve des Puffs I-18-C (Kurve III in Abb. 9, IV in Abb. 15) der tatsächliche Verlauf der Veränderungen des Hormontiters in der Hämolymphe nach Injektion von 45 CE wiedergegeben. Wir versuchten oben (S. 626), diese Kurve damit zu erklären, daß die Verminderung des injizierten Ecdysons wettgemacht würde durch die eigene Hormonproduktion der Larve. Tatsächlich ist auf der Basis dieser Hypothese auch der Gesamtverlauf der Größenkurve des Puffs IV-2-B nach Injektion von 45 CE Ecdyson (Kurve III in Abb. 15) — abgesehen von dem Abfall nach 48 Std — besonders gut verständlich. Diese Kurve ist nämlich nach 24 Std und auch nach 48 Std praktisch noch gar nicht abgefallen, obwohl auch dann der Titer des injizierten Hormons bereits niedriger geworden sein sollte; andererseits fällt sie danach rascher ab, als es für den Ecdyson-titer nach dem Verlauf der Kurven I und II zu erwarten wäre. Das erforderte für ihre Erklärung als Zeit-Kurve der Abnahme des injizierten Hormons entsprechend den Kurven I und II bereits Zusatzannahmen. Kann das Gen dagegen auch bei Gegenwart von Ecdyson inaktiv werden, dann steht der Annahme einer Aktivierung der Prothoraxdrüsen nichts im Wege, und die dadurch verursachte Hormonzunahme sorgt für die gleichbleibende Größe des Puffs während mehr als 48 Std nach der Injektion. Bei der langsamen Puffrückbildung nach Injektion von 15 CE und der schnelleren Rückbildung zwischen 48 und 72 Std

nach der Injektion von 45 CE Ecdyson handelte es sich dann zwar um gleiche, aber ganz verschieden verursachte Phänomene.

Die Aktivierungen der Gene I-18-C und IV-2-B erfolgen beide im Rahmen von Prozessen, die sehr bald nach der Häutungsinduktion durch das Ecdyson einsetzen. Um so interessanter ist die Frage, ob eine *Abhängigkeitsbeziehung zwischen diesen beiden Genreaktionen* im Sinne des oben (S. 630) Erörterten besteht, oder ob sie zu Reaktionsketten gehören, die unabhängig voneinander sind. Die Frage läßt sich zwar erst im speziellen Experiment klären, auch aus unseren Untersuchungen sind aber Hinweise möglich, wenn man die Korrelation der beiden Reaktionen in den einzelnen Tieren prüft. Bisher hatten wir nur Versuchsgruppen, also Durchschnittswerte verglichen. Trennen kann man wieder die Frage nach der *Aktivierung* von der nach dem *Erhaltenbleiben des aktivierten Zustandes*.

Für die Frage, ob die Puffs unabhängig voneinander aktiviert werden können, ist man auf den Vergleich in solchen Tieren angewiesen, die 2—8 Std nach der Injektion einen der beiden Puffs nicht besitzen. Bei später fixierten Tieren läßt sich nicht ausschließen, daß ein eventuell fehlender Puff schon wieder rückgebildet ist, nachdem er seinen aktivierenden Einfluß auf den anderen ausgeübt hat.

Tabelle 2. *Größe der Puffs I-18-C und IV-2-B in den Tieren, in denen eines der beiden Gene nicht reagiert hat. Beim Puff IV-2-B bedeuten die Größenklassen 0 und 1, beim Puff I-18-C nur die Klasse 0, daß sicher keine Reaktion erfolgt ist*

| Protokoll<br>Nr. | Größenklasse<br>des Puffs |        |
|------------------|---------------------------|--------|
|                  | I-18-C                    | IV-2-B |
| 147              | 0                         | 0      |
| 280              | 0                         | 1      |
| 43               | 1                         | 1      |
| 151              | 1                         | 1      |
| 264              | 2                         | 0      |

Von den Tieren — im gesamten Versuchsmaterial —, die nach 2—8 Std fixiert worden waren, fehlte nur in vieren der Puff I-18-C, eins davon ist ein *tentans*  $\times$  *pallidivittatus*-Bastard, bei einem zweiten ließ sich das IV. Chromosom ebenfalls nicht untersuchen. In der Tabelle 2 sind alle Tiere zusammengestellt, bei denen 2 bis 8 Std nach der Injektion einer der beiden Puffs keine Reaktion zeigte und sich beide Chromosomen auswerten ließen. Beim Puff IV-2-B müssen die Größenklassen 0 und 1 als die angesehen werden, bei denen keine Reaktion erfolgt ist; sie sind daher zusammenzufassen.

Es ergibt sich (Tabelle 2), daß bei den Tieren, in denen der Puff I-18-C fehlt, auch der Puff IV-2-B nicht vergrößert ist. Einige Tiere besitzen dagegen, wenn auch in schwacher Ausbildung, den Puff I-18-C, ihnen fehlt jedoch ein stark entwickelter Puff IV-2-B. Bei den Tieren, in denen beide Puffaktivierungen nicht eingetreten sind, ist nicht zu sagen, worauf der negative Versuchsausfall beruht, möglicherweise handelt es sich um Versuchsfehler (s. S. 614). Wenn nur eine Puffreaktion ausgeblieben ist, ist es die des Puffs IV-2-B. Wenn also, so muß man schließen, überhaupt eine Kausalbeziehung zwischen den Reaktionen der beiden Puffs besteht, so muß der *Puff I-18-C der primär*

reagierende sein, der den anderen aktiviert. Damit steht sein etwas früheres Auftreten ebenso in Einklang wie sein früheres Aktivwerden in der Normalentwicklung (s. Teil II) und nach Beendigung der Diapause (noch unveröffentlicht), wie auch die oben (S. 640) beschriebene stärkere Abhängigkeit seiner Aktivität vom Ecdyson. Die andere Möglichkeit ist aber natürlich noch offen, daß beide Gene unabhängig auf das Ecdyson bzw. andere davon in Gang gesetzte Prozesse reagieren.

Tabelle 3. Größe der Puffs I-18-C und IV-2-B in den Tieren, die 24 Std nach der Injektion von 15 CE Ecdyson fixiert wurden

| I-18-C<br>IV-2-B   |       | Anzahl Tiere in Größenklasse |   |   |   |    |
|--------------------|-------|------------------------------|---|---|---|----|
|                    |       | 0                            | 1 | 2 | 3 |    |
| Größen-<br>klassen | 0 + 1 | 1                            | 4 |   |   | 5  |
|                    | 2     |                              | 3 | 1 |   | 4  |
|                    | 3     |                              | 1 | 1 | 2 | 4  |
|                    |       | 1                            | 8 | 2 | 2 | 13 |

Auch zwischen der Dauer und dem Ausmaß des Aktivbleibens der beiden Puffs in längerem Abstand von der Injektion besteht offenbar eine Beziehung. Nach Injektion von 15 CE haben sich beide Puffs 24 Std später teilweise zurückgebildet. Das Ausmaß der Rückbildung der beiden Puffs scheint im Einzeltier positiv korreliert zu sein (Tabelle 3). Auch hier ist freilich wieder unbekannt, ob die Aktivität des einen Puffs für die des anderen verantwortlich ist, oder ob beide von demselben dritten Faktor reguliert werden. Daß aber sowohl ihre Aktivierung als auch ihr Aktivitätszustand in der ersten Zeit nach der Injektion in irgendeiner Weise korrelierte Prozesse sind, steht außer Zweifel.

### 3. Der Puff I-19-A

Im Verlauf der Vorpuppenentwicklung, vor allem gegen Ende dieser Phase, stellen eine Reihe von Genen ihre Tätigkeit regelmäßig ein. Das mag mit dem allmählichen Erlöschen der Tätigkeit der Drüsen überhaupt — die dann histolysiert werden — zusammenhängen, es könnte aber auch sein, daß solche Gene an Prozessen mitwirken, die der Aufrechterhaltung des Larvenzustandes, d.h. der Hemmung des Metamorphoseeintritts dienen. Um so interessanter war daher der Befund, der bereits in den ersten Untersuchungen erhoben wurde (s. CLEVER und KARLSON 1960), daß eins dieser Gene etwa ebenso schnell auf die Hormoninjektion mit Puffrückbildung reagiert wie die bisher beschriebenen mit Erhöhung ihres Aktivitätsgrades.

Dieses Gen liegt im Abschnitt 19-A des I. Chromosoms. Gewöhnlich ist in Larven, die noch nicht mit der Metamorphose begonnen haben,

ein Puff in wechselnder Größe ausgebildet; nur selten fehlt er. In jungen und mittelalten Vorpuppen ist der Puff ebenfalls vorhanden und zwar gewöhnlich in stärkerer Ausbildung; in alten Vorpuppen fehlt er regelmäßig.

Die Lokalisation des Puffs ergibt sich aus Abb. 18b (Pfeil) und den übrigen Abbildungen der Chromosomenabschnitte I-18/19.

Die die Abschnitte 18 und 19 trennende Querscheibengruppe wird distal von einer dickeren, gewöhnlich unterbrochen strukturierten Querscheibe begrenzt. Je nach dem Streckungszustand des Chromosoms im Präparat erscheint diese Querscheibe mit der Scheibengruppe verschmolzen oder von ihr getrennt. Im ersteren Falle wirkt die Querscheibengruppe an ihrem distalen Rand „zerfranst“, wie es in den meisten der hier gegebenen Abbildungen erscheint. Distalwärts folgt dann eine dünne Querscheibe, die bei Ausbildung des Puffs nicht erkennbar ist. Ob diese Querscheibe selbst den Puff bildet, oder ob der Puff in ihrer engsten Nachbarschaft entsteht — ähnlich wie es oben (S. 613) für den Puff I-18-C beschrieben wurde —, war nicht zu entscheiden; einzelne Befunde wären mit der letzteren Annahme leichter verständlich (s. S. 646). Die auf diese „puffbildende“ Querscheibe distal folgende ist wieder dicker und gewöhnlich unterbrochen. Dadurch, daß der Puff, bzw. die Region, in der er liegt, proximal und distal von unterbrochenen Querscheiben begrenzt wird, wird manchmal auch dann das Vorhandensein eines Puffs vorgetäuscht, wenn er tatsächlich fehlt. Eine sichere Entscheidung erlaubt immer die Struktur der mittleren Querscheibe und die Grünfärbung des Puffs. Bei der ersten Auswertung, als der genaue Bau dieser Chromosomenregion noch nicht bekannt war, wurde in einigen Fällen falsch geurteilt, wodurch vor allem die Kontrollen betroffen waren. Tatsächlich fehlt der Puff auch hier bei etwa 10% der Tiere.

Die Größe, die der Puff I-19-A gewöhnlich erreicht, entspricht etwa der des Nachbarpuffs I-18-C; er kann etwas größer werden. Um die Puffgrößen unter den verschiedenen Bedingungen des Experiments erfassen zu können, wurden wieder *Größenklassen* gebildet. Wegen der Ähnlichkeit mit dem Puff I-18-C lassen sich die dort gegebenen Definitionen der Größenklassen (s. S. 615) auch hier sinngemäß verwenden.

In den *Versuchskontrollen* ist der Puff in sämtlichen Größenklassen vorhanden, bevorzugt in den Klassen 3 und vor allem 2 (s. Abb. 16). Diese Häufigkeitsverteilung der Puffgrößen ist als Ausgangszustand vor der Injektion des Ecdysons anzusehen, wenn man das gesamte Versuchsmaterial betrachtet. Die verschiedenen Puffgrößen sind jedoch nicht in allen Kulturen gleich häufig; neben Kulturen, in denen der Puff bei fast allen Tieren sehr stark ausgebildet ist, gibt es andere, in denen er meistens nur in geringer Größe vorhanden ist.

Streng genommen dürfte man daher stets nur Tiere eines Einzelversuchs, die aus einer Kulturschale stammen, miteinander vergleichen. Dann werden aber die Anzahlen der Versuchstiere zu klein. Um etwas größere Anzahlen zu haben, mußten daher hier die gleich behandelten Tiere aus mehreren Einzelversuchen zusammengefaßt — nur einige Zuchten mit extremen Puffgrößen wurden ausgeschieden — und ihnen nur die Kontrollen aus denselben Zuchten gegenübergestellt werden. Die Häufigkeitsverteilung der Puffgrößen in diesen Kontrollen sollte der

bei den jeweiligen Versuchstieren vor der Injektion entsprechen. Die hier an Hand des jeweils zusammengefaßten Zahlenmaterials dargestellten Versuchsergebnisse lassen sich auch aus Einzelversuchen ablesen, wie an einem Beispiel gezeigt werden wird.

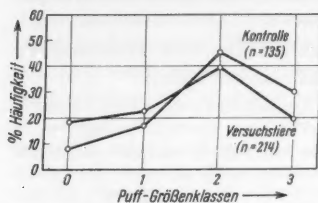


Abb. 16. Häufigkeiten der verschiedenen Größenklassen des Puffs I-19-A in den Kontrollen und im Gesamtmaterial nach der Injektion von Ecdyson

an der anderen Zusammensetzung des Versuchsmaterials (s. unten). Im Durchschnitt betrachtet, reagiert der Puff im Abschnitt I-19-A auf eine Injektion von Ecdyson also mit Verringerung seiner Größe (Abb. 16).

Mit den hier gewählten Methoden ließ sich der *Beginn der Puffrückbildung*, d.h. also ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Puff-

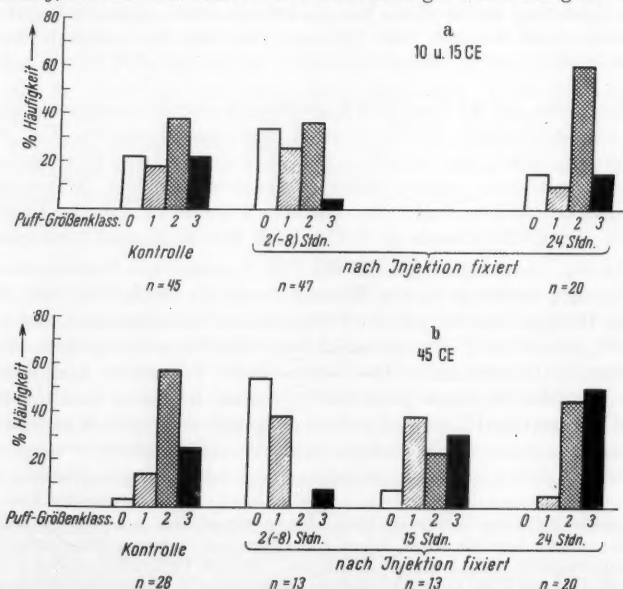


Abb. 17 a u. b. Häufigkeiten der verschiedenen Größenklassen des Puffs I-19-A bei Tieren, die zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion fixiert wurden. a Nach Injektion von 10 und 15 CE, b nach Injektion von 45 CE Ecdyson

größen frühestens 2—8 Std nach der Injektion nachweisen. Die nach 2—8 Std fixierten Tiere wurden wieder soweit wie möglich zusammengefaßt. Ob innerhalb der Gruppe Unterschiede bestehen, ist schwer zu beurteilen; anscheinend ist das nicht der Fall. Jedenfalls zeigt die Versuchsgruppe insgesamt aber einen deutlichen Unterschied gegenüber der Kontrolle (Abb. 17a und b).

Das früher fixierte Material ist gering, stammt aus einer größeren Anzahl von Versuchen und hat eine entsprechend große Streuung. Ein Unterschied in der Häufigkeit der Puffgrößen gegenüber den Kontrollen ist nicht erkennbar; er ist aber auch nicht sicher auszuschließen, zumal wenn man daran denkt, daß sich geringe Größenverschiebungen bei Veränderungen vorhandener Puffs vielschwerer erkennen lassen, als bei Puffinduktionen de novo wie im Falle des Puffs I-18-C.

Bei einer Anzahl von Tieren, vor allem in der Versuchsgruppe, der 45 CE Ecdyson injiziert worden waren, ist der Puff nach 2—8 Std vollständig rückgebildet worden, und zwar anscheinend auch bei solchen Tieren, die ihn ursprünglich in der Größenklasse 2 besaßen (vgl. Abb. 17b,

Tabelle 4. Größe des Puffs I-19-A bei Tieren eines Versuchs, denen 45 CE Ecdyson injiziert worden waren (s. auch Abb. 18)

| Fixiert<br>Std. nach<br>Injektion | Anzahl Tiere<br>in Größenklasse |   |   |   |
|-----------------------------------|---------------------------------|---|---|---|
|                                   | 0                               | 1 | 2 | 3 |
| 6                                 | 3                               |   |   |   |
| 24                                |                                 | 1 | 5 | 1 |
| Kontrolle                         |                                 |   | 5 | 1 |

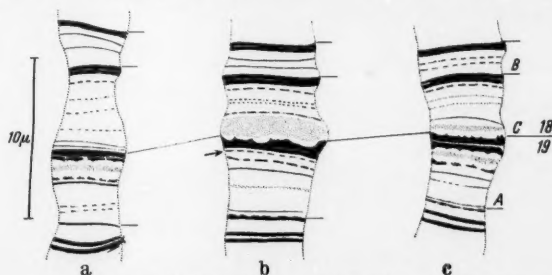


Abb. 18a—c. Veränderungen des Puffs I-19-A nach Injektion von 45 CE Ecdyson. a Unbehandelte Kontrolle, b 6 Std, c 24 Std nach der Injektion fixiert. Der Pfeil in b markiert die Querscheibe, die gewöhnlich in dem Puff aufgeht

Kontrolle und die nach 2—8 Std fixierten). Wie schnell Puffs dieser Größe sich tatsächlich rückbilden können, zeigt das Ergebnis eines Einzelversuchs, das hier zugleich als Ergänzung zu den zusammengefaßten Ergebnissen mitgeteilt werden soll.

Der Versuch wurde mit 16 Tieren durchgeführt, die aus derselben Tochterkultur stammten. Die als Kontrollen fixierten Tiere enthielten den Puff fast einheitlich in mittlerer Größe (Tabelle 4 und Abb. 18a). Es ist also höchstwahrscheinlich, daß ihn auch die Versuchstiere praktisch alle mindestens in der Größe 2 besaßen. Allen 6 Std nach der



Injektion von 45 CE Ecdyson fixierten Tieren fehlte der Puff (Tabelle 4, Abb. 18b).

Es überrascht, daß bei dem in Abb. 18b abgebildeten Chromosom auch die betroffene Orceinquerscheibe bereits wieder ganz normale Ruhestuktur zeigt, ohne noch an den verschwundenen Puff zu erinnern. Das wäre am leichtesten verständlich mit der Annahme, daß der Puff nicht von dieser Querscheibe gebildet wird, sondern in ihrer Nähe, eventuell von einer dünnen benachbarten, ihr eng anliegenden Bande, deren allzu feine Struktur bei der gewählten Präparationstechnik nicht erkennbar ist (s. auch S. 613 und S. 643).

6 Std reichen also für die vollständige Rückbildung eines Puffs mittlerer Größe aus; andererseits war aber auffällig, daß in einigen Versuchen, in denen die Tiere im Ausgangszustand einen ungewöhnlich großen Puff besaßen, er auch bei 2 und 4 Std nach der Injektion fixierten Tieren noch recht groß war, teils sogar noch der Klasse 3 angehörte. Die Tiere dieser Versuche sind in der Abb. 17 nicht enthalten. Die nach einer Rückbildungsdauer von 2—8 Std *verbliebene Größe wird* also auch *von der Ausgangsgröße beeinflusst*.

Die Frage ist nun, ob die Häufigkeitsverteilung der Puffgrößen bei den 2—8 Std nach der Injektion fixierten Tieren einen *Endzustand der Rückbildung* widerspiegelt, oder ob die Rückbildung in jedem Fall *bis zum völligen Verschwinden* des Puffs geht, die in den Diagrammen der Abb. 17 den höheren Größenklassen angehörenden Puffs sich also noch in Rückbildung befinden.

Da sich an die Rückbildung bald eine Puffneubildung anschließt (s. unten), sind Versuchsgruppen, deren sämtlichen Tieren der Puff fehlt, nicht zu erwarten, wenn man noch länger als 8 Std mit der Fixierung wartete. Der Zustand völliger Rückbildung wäre in jedem Fall höchstens eine notwendige Durchgangsstufe. Die Neubildung setzt jedoch erst später ein, so daß sie das Bild bei den nach 2—8 Std fixierten Tieren noch nicht verwirrt.

Nun weist schon der erwähnte Befund, daß anscheinend zwischen den nach 2, 4, 6 oder 8 Std fixierten Tieren kein Unterschied in der Häufigkeit der Puffgrößen besteht, darauf hin, daß die Rückbildung bald endet. Bei der breiten Streuung ist das Material aber zu gering, um hieraus allein sicher schließen zu können. Weiter ist anzuführen, daß in keinem Fall eine später fixierte Versuchsgruppe gefunden wurde, die im Durchschnitt eine geringere Puffgröße aufwies, als die 2—8 Std nach der Injektion fixierten. Das aber wäre zu erwarten, wenn die besondere Häufigkeit großer Puffs in Versuchen, in denen die Puffs vor der Injektion (Kontrollen) sehr groß waren, Anzeichen für *verzögerte* und nicht für *unvollständige* Rückbildung wären. Das gleiche gilt auch für die starke Besetzung der positiven Größenklassen nach Injektion geringerer Ecdysondosen (Abb. 17a). Anzeichen dafür, daß die Rückbildung unter unterschiedlichen Bedingungen mit verschiedenen Geschwindigkeiten vonstatten ginge, fanden sich nicht.

Daß die im Diagramm Abb. 17 abgebildete Klassenverteilung für die nach 2—8 Std fixierten Tiere im Durchschnitt — einzelne Ausnahmefälle darin sind natürlich möglich — einen statischen Zustand wiedergibt, dafür ist ein weiteres Argument darin zu sehen, daß die Größe dieses Puffs in den Einzeltieren mit der des Puffs I-18-C, der sich in dieser Zeit sicher nicht verändert, korreliert ist: Wir sahen oben, daß der Puff I-18-C nach 2 Std eine bestimmte Größe angenommen hat, die dann über einen Zeitraum von wenigstens 10 Std erhalten bleibt (s. S. 618). Je größer nun in einem Tier der induzierte Puff I-18-C ist, um so kleiner ist der Nachbarpuff I-19-A (Tabelle 5). Diese negative Korrelation wäre kaum verständlich, wenn der Puff I-19-A in derselben Zeit wesentliche Größenveränderungen durchmachte.

Die Korrelation zwischen den Größen der Puffs I-18-C und I-19-A ist naturgemäß nicht ganz streng, da — ganz abgesehen von einer gewissen Willkür bei der Beurteilung — in die Größe des Puffs I-19-A noch Faktoren, wie z.B. die Ausgangsgröße, eingehen, die nichts mit dem Experiment zu tun haben.

Tabelle 5. Größe der Puffs I-18-C und I-19-A in den Tieren, die 2—8 Std nach der Injektion fixiert wurden

| I-18-C<br>I-19-A   |   | Anzahl Tiere in Größenklasse |    |    |    |
|--------------------|---|------------------------------|----|----|----|
|                    |   | 0                            | 1  | 2  | 3  |
| Größen-<br>klassen | 0 |                              | 1  | 9  | 15 |
|                    | 1 | 1                            | 4  | 12 | 6  |
|                    | 2 | 3                            | 5  | 8  | 3  |
|                    | 3 |                              | 1  |    |    |
|                    |   | 4                            | 11 | 29 | 24 |
|                    |   |                              |    |    | 68 |

Der Schluß erscheint also berechtigt, daß die Reduktion der Puffgröße nur soweit geht, wie es in der Verschiebung der Häufigkeitsmaxima in den Diagrammen der Abb. 17 zum Ausdruck kommt und das *Ecdyson* nicht in jedem Falle die vollständige Rückbildung des Puffs, also auch keine völlige Inaktivierung dieses Gens — auch keine vorübergehende — induziert. Der Zustand verringerter Größe wird innerhalb kurzer Zeit nach der Injektion (2 Std oder höchstens wenig mehr; das mag im Einzelfall auch von der Ausgangsgröße abhängen) erreicht und bleibt dann über einen Zeitraum von wenigstens einigen Stunden erhalten.

Von den Faktoren, die Einfluß darauf haben, bei welcher Größe die Puffrückbildung zum Stillstand kommt, wurde die Ausgangsgröße des Puffs bereits erwähnt. Der Vergleich der Abb. 17a und b zeigt weiter, daß der Puff um so stärker rückgebildet wird, je höher die injizierte *Ecdyson*dosis ist. Aber selbst bei der Dosis von 45 CE ist die Rückbildung nur bei der Hälfte der Tiere vollständig. Bei den niedrigeren Dosen ist die Verteilung der Puffgrößen nur leicht nach links verschoben. Auch die durch diese Dosen erreichte *Ecdyson*konzentration in der Hämolymphe ist aber wahrscheinlich noch unphysiologisch hoch. Es überrascht daher nicht, daß sich zu Beginn der normalen Metamorphose (Voruppenphase) keine Reduktion des Puffs I-19-A nachweisen ließ

(s. Teil II). Daraus folgt, daß *Gegenwart von Ecdyson und Aktivität des Gens in Abschnitt I-19-A* einander jedenfalls nicht ausschließen. Das wird noch deutlicher, wenn das Verhalten des Puffs in den Tieren betrachtet wird, die erst in längerem Abstand von der Injektion fixiert wurden.

Spätestens 15 Std nach der Injektion ist eine *Neubildung des reduzierten Puffs* im Gange (s. Abb. 17b); eingesetzt hat sie möglicherweise schon nach 12 Std: von 5 Tieren, die dann fixiert worden waren, gehörten eins zur Klasse 0, zwei zur Klasse 1 und je eins zu den Klassen 2 und 3. Nach 24 Std sind in fast allen Tieren wieder große Puffs vorhanden. Dieser Zustand bleibt dann auch noch lange erhalten: von fünf nach 48 Std fixierten Tieren (45 CE Ecdyson) hatten vier ihn in der Größe 3, eins ihn in der Größe 2; fünf nach 72 Std fixierte Tiere hatten ihn sämtlich in der Größe 2. — Die Neubildung des rückgebildeten Puffs bestätigt sich schließlich auch in dem oben dargestellten Einzelversuch (s. S. 645 und Abb. 18c).

Vergleicht man in Abb. 17 die Puffgröße, die nach 24 Std erreicht ist, mit der in den jeweiligen Kontrollen, so fällt auf, daß dann sogar ein größerer Anteil den großen Puffklassen angehört, und zwar um so mehr, je höher die injizierte Ecdysondosis war (s. Abb. 17a und b). Bei der Wiedervergrößerung der Puffs handelt es sich also nicht nur um ein Rückgängigmachen der induzierten Depression, vielmehr kann man, unter Vernachlässigung der vorübergehenden Rückbildung des Puffs, aus den Befunden ablesen, daß durch das Ecdyson *das Gen im Abschnitt I-19-A unabhängig vom Ausgangszustand zu verstärkter Aktivität* veranlaßt wird. Diese Aktivierung beginnt zwischen 10 und 15 Std nach der Hormoninjektion und wird von der Höhe der injizierten Hormondosis beeinflusst. Ein Zustand erhöhter Aktivität dieses Gens wurde ebenfalls in jungen Vorpuppen gefunden (s. Teil II).

Die zuletzt geschilderten Befunde sprechen ebenso wie das Verhalten des Puffs in der Normalentwicklung dafür, daß es sich bei der Aktivität dieses Gens um eine *grundsätzlich entwicklungsunspezifische* handelt, die jedoch an einem Stoffwechselvorgang beteiligt ist, der während der Vorpuppenphase besonders intensiv ist. Genreaktionen solcher Art werden wir im nächsten Kapitel noch mehrere kennenlernen. Gegen eine solche Deutung ließe sich vorläufig noch die Puffrückbildung kurz nach der Hormoninjektion einwenden, die außerdem natürlich für die Frage der primären Hormonreaktion wichtiger ist als die spätere Puffaktivierung. Ihr müssen wir uns daher noch einmal zuwenden.

Die Neubildung des Puffs so bald nach der Injektion sichert zunächst den oben bereits gezogenen Schluß, daß *bloße Anwesenheit* von Ecdyson die Aktivität des Gens I-19-A jedenfalls nicht hindert, denn wir sahen in den Kapiteln C 1 und C 2, daß, mindestens nach Injektion

von 45 CE, Ecdyson jedenfalls über 24 Std, wahrscheinlich sogar über 48 und 72 Std hinaus in der Hämolymphe vorhanden bleibt. Gerade nach dieser hohen Injektionsdosis erfolgt aber auch die Neubildung besonders stark.

Nun fehlt der Puff I-19-A ja in der Normalentwicklung in sehr alten Vorpuppen und man könnte vermuten, daß die Rückbildung hier und im Experiment auf die gleichen Ursachen zurückgeht. So könnte man etwa daran denken, daß *sehr hohe Hormonkonzentration* die Aktivität des Gens verhindert, zumal da die Rückbildung ja dosisabhängig ist. Zweifellos ist sie unmittelbar nach der Injektion am größten und man müßte dann annehmen, daß sie auch in alten Vorpuppen höher als zuvor wäre. Gegen diese Hypothese spricht aber wieder, daß gerade nach Injektion hoher Dosen die Neubildung besonders stark ist; hinge die Genaktivität unmittelbar von der jeweiligen Hormonkonzentration oder von einem von ihr ständig gesteuerten Prozeß ab, so wäre zumindest zu erwarten, daß die Puffneubildung um so später einsetzt, je höher die injizierte Dosis war. Das ist sicher nicht der Fall. Trotzdem prüften wir die Frage, ob sehr hohe Ecdyskonzentration Rückbildung des Puffs I-19-A zur Folge hat, wegen ihrer großen Bedeutung noch experimentell.

Wir gingen hierzu davon aus, daß in alten Vorpuppen der Puff fehlt, während er in jüngeren und in solchen mittleren Alters besonders groß ist. Erfolgte die Rückbildung in alten Vorpuppen durch weitere Erhöhung des Ecdysontiters, so sollte sie sich auch in jüngeren Vorpuppen durch Hormoninjektion erzwingen lassen, obwohl dann keine unmittelbare Induktion neuer Puffs zu erwarten ist, da die die Metamorphose einleitenden Puffaktivierungen (I-18-C, IV-2-B) bereits erfolgt sind. In Vorpuppen mittleren Alters sollte die Hormonkonzentration nach unseren allgemeinen Kenntnissen über die Häutungsregulation schon sowieso recht hoch sein, was auch mit der starken Ausbildung, die die Puffs konzentrationsempfindlicher Gene (I-18-C und IV-2-B) dann haben, übereinstimmt. Man kann also sicher sein, durch zusätzliche Hormoninjektion eine höhere Konzentration zu bekommen, als sie normalerweise in Vorpuppen vorkommt.

Zum Versuch wurden Vorpuppen ausgewählt, die ihrem Aussehen nach etwa das geeignete Alter hatten. Ihnen wurden 15 CE Ecdyson injiziert und die Tiere 3—4 Std nach der Injektion fixiert.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieses Versuchs doppelt aufgeführt, und zwar ist einmal das gesamte Versuchsmaterial dem Gesamtmaterial aller bisher untersuchten unbehandelten Vorpuppen gegenübergestellt, außerdem die Gruppe der injizierten Tiere, welche sowohl dem Ausbildungszustand des Puffmusters als dem der Imaginalscheiben nach etwa gleich alt waren, einer Gruppe ihnen gleich alter Vorpuppen.

Tabelle 6. Größe des Puffs I-19-A in Vorpuppen, die 3—4 Std nach der Injektion von 15 CE Ecdyson fixiert wurden, und in unbehandelten Vorpuppen. Die Vorpuppen des gleichen Alters sind in beiden Gruppen zusätzlich getrennt aufgeführt

|                                     | % Tiere in Größenklasse |      |      |      | n  |
|-------------------------------------|-------------------------|------|------|------|----|
|                                     | 0                       | 1    | 2    | 3    |    |
| Mittelalte Vorpuppen + Ecdyson . .  |                         |      | 55,6 | 46,4 | 9  |
| Vorpuppen + Ecdyson, gesamt . .     |                         |      | 53,8 | 48,2 | 13 |
| Mittelalte Vorpuppen, Kontrolle . . |                         |      | 56,3 | 43,7 | 16 |
| Vorpuppen gesamt, Kontrolle . . .   | 11,1                    | 16,7 | 45,9 | 26,4 | 72 |

Das Ergebnis zeigt eindeutig, daß zusätzliches Ecdyson in Vorpuppen keine Verkleinerung des Puffs I-19-A mehr bewirkt, geschweige denn eine völlige Unterdrückung der Aktivität dieses Gens. Daraus folgt aber, daß es auch nicht die sehr hohe Konzentration des Ecdysons in der Hämolymphe unmittelbar nach der Injektion oder am Ende der Vorpuppenphase sein kann, die die Rückbildung des Puffs I-19-A bewirkt.

Tabelle 7. Größe des Puffs I-19-A in unbehandelten Vorpuppen, die den Puff I-18-C in der Größe 3 besitzen

|                  | Größenklassen |    |   |   |
|------------------|---------------|----|---|---|
|                  | 0             | 1  | 2 | 3 |
| Anzahl der Tiere | 6             | 11 | 4 | 8 |

Es gibt noch eine Gemeinsamkeit zwischen den beiden Phasen, in denen der Puff I-19-A fehlt oder höchstens schwach aktiv ist, das ist die starke Aktivität des Nachbarpuffs I-18-C. Besteht etwa ein Antagonismus im Verhalten

dieser beiden Puffs derart, daß die starke Aktivität des einen notwendig die des anderen ausschließt? Darauf scheint die bereits erwähnte negative Korrelation der Größe dieser beiden Puffs in den einzelnen 2—8 Std nach der Injektion fixierten Tieren tatsächlich hinzuweisen (s. S. 647 und Tabelle 5).

Die Normalentwicklung zeigt aber schon, daß jeder der beiden Puffs jede Größe unabhängig von der des anderen haben kann: In Larven vor Eintritt in die Metamorphose fehlt der Puff I-18-C immer; trotzdem kann auch der Puff I-19-A klein sein oder fehlen. In der Vorpuppenentwicklung erreicht dagegen der Puff I-18-C früher seine Maximalgröße, als der Puff I-19-A verschwindet; dann kann gleichzeitig mit dem Puff I-18-C in der Größe 3 der Puff I-19-A in jeder Größe vorhanden sein (Tabelle 7).

Aber auch in der experimentell ausgelösten Metamorphose verschwindet die zunächst bestehende Korrelation der Puffgröße bald wieder. Das geht schon daraus hervor, daß die Neubildung des Puffs I-19-A und das Erhaltenbleiben des Puffs I-18-C in bedeutender Größe durch denselben Faktor bewirkt werden (Injektion hoher Ecdyson-

dosen). Daß eine Beziehung zwischen den Puffgrößen dann auch im Einzeltier nicht mehr besteht, zeigt die Korrelationstabelle für die nach 24 Std fixierten Tiere (Tabelle 8).

Die Größe der Puffs I-19-A und I-18-C ist also sicher *nicht allgemein negativ korreliert*. Die Korrelation besteht vielmehr eindeutig nur in dem relativ kurzen Zeitraum nach der Induktion der Puffveränderungen. Korreliert ist, so muß man schließen, die Größe des Puffs I-19-A nicht mit der Größe des Puffs I-18-C, sondern mit dem Ausmaß der plötzlichen und starken *Größenveränderungen*, die er durch die Induktion erfährt. Worin diese Beziehung der beiden Puffs besteht, ob es überhaupt eine direkte Beziehung zwischen ihnen selbst ist, oder ob sie gemeinsam von einem dritten Faktor abhängen, muß offenbleiben. Wenn eine direkte Beziehung besteht, ist wohl zweifellos die Reaktion des Puffs I-18-C die primäre. Man könnte an „Konkurrenzwirkungen“ seitens desentstehenden auf den in seiner Nähe vorhandenen Puff denken.

Es mögen aber auch ganz andere, infolge der abnormen und plötzlichen Metamorphoseeinleitung ausgelöste Prozesse im Spiele sein.

Wir stellten eingangs dieses Kapitels (S. 642) die Frage, ob die hormonale Häutungsauslösung als Enthemmung aufzufassen sei und ob sich Anhaltspunkte dafür fänden, daß ein Puff vor Eintritt einer Larve in die Metamorphose an einer solchen Hemmung beteiligt sei. Das Verhalten des Puffs I-19-A nach der Injektion schien diese Möglichkeit nahezulegen. Nach allem hier Dargestellten ist die Rückbildung dieses Puffs jedoch kein in die normale Häutungsauslösung eingeschalteter Prozeß, vielmehr erfolgt sie wahrscheinlich infolge der künstlichen und das Tier unvorbereitet treffenden Entwicklungsanregung. Damit fehlt jetzt jeder Hinweis darauf, daß die Häutung über die Entblockierung einer gesteuerten Hemmung ausgelöst wird.

Die bisher als Arbeitshypothese benutzte Gleichwertung der Rückbildung des Puffs I-19-A am Ende der Vorpuppenzeit und nach Ecdysoninjektion trifft offenbar nicht zu. Wir gelangten oben bereits zu der Auffassung, daß die *Puffbildung des Gens I-19-A eine entwicklungsunspezifische Reaktion* sei. Ist diese Auffassung richtig, dann läßt sich die Inaktivierung am Ende der Vorpuppenzeit leicht einordnen in eine Reihe von Inaktivierungen solcher Puffs, die während des größten Teils der Larvenentwicklung tätig sind. Damit steht in gutem Einklang, daß die

Tabelle 8. Größe der Puffs I-18-C und I-19-A in den Tieren, die 24 Std nach der Injektion fixiert wurden

| I-18-C<br>I-19-A   |   | Anzahl Tiere in Größenklasse |    |    |   |    |
|--------------------|---|------------------------------|----|----|---|----|
|                    |   | 0                            | 1  | 2  | 3 |    |
| Größen-<br>klassen | 0 |                              |    | 1  | 1 | 2  |
|                    | 1 |                              | 1  | 2  |   | 3  |
|                    | 2 | 2                            | 7  | 11 | 3 | 23 |
|                    | 3 |                              | 4  | 10 | 2 | 16 |
|                    |   | 2                            | 12 | 24 | 6 | 44 |

Rückbildung des Puffs I-19-A im Verlaufe von Larvenhäutungen nicht erfolgt (s. auch S. 647 und Teil II).

Das eigentlich Neue bei der Reaktion des Gens im Abschnitt I-19-A ist also darin zu sehen, daß ein entwicklungsunspezifischer Puff durch das Ecdyson beeinflusst und sogar vergrößert wird. Hiermit steht es jedoch nicht allein, wie im nächsten Kapitel gezeigt werden soll.

#### 4. Entwicklungsunspezifische Puffs

Die als erste auf die Injektion reagierenden Gene I-18-C und IV-2-B werden aus jeweils für die Larvenzeit typischen Aktivitätszuständen in

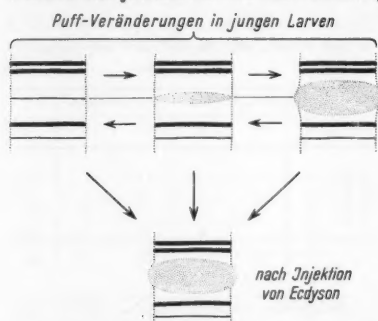


Abb. 19. Reaktionsschema der entwicklungsunspezifischen Puffs, welche sich nach der Ecdysoninjektion unabhängig von dem jeweiligen Ausgangszustand stark vergrößern

ihren Aktivitätsgrad regelmäßig nach der Häutungseinleitung durch das Ecdyson.

In der Abb. 19 ist die *Reaktionsweise solcher Gene mit entwicklungsunspezifischen Puffs* schematisch dargestellt. In jüngeren Larven, die noch nicht mit der Metamorphose begonnen haben, verändert sich die Aktivität dieser Gene ständig; Puffs können fehlen, und sie können sehr groß sein (Abb. 19, obere Reihe). Injiziert man nun Ecdyson und löst dadurch die Metamorphose aus, so wird, unabhängig vom Ausgangszustand, ein großer Puff ausgebildet (Abb. 19, unten). In der normalen Vorpuppenphase sind durchweg größere Puffs vorhanden. Das Gen I-19-A, das in diese Gruppe gehört, zeigte noch andere Besonderheiten. Wir wollen uns nun Genreaktionen, die ganz klar diesem Typ angehören, zuwenden. Von ihnen gibt es in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* eine größere Anzahl. Wir beschränken uns auf die Besprechung weniger Beispiele.

solche überführt, die wiederum für das eingeleitete Entwicklungsstadium spezifisch sind. Es gibt jedoch auch puffbildende Gene, bei denen weder der Aktivitätszustand als solcher, noch der Aktivitätsgrad an bestimmte Entwicklungsphasen gebunden ist, die also sicher an Teilen des Zellstoffwechsels beteiligt sind, die nicht spezifisch für Entwicklungsvorgänge sind. Auch von diesen Genen verändern jedoch einige



Im Abschnitt 17-B des I. Chromosoms kann ein Puff liegen, der bei maximaler Ausbildung wohl der größte in den Speicheldrüsenchromosomen ist, wenn man von den Balbiani-Ringen absieht. Die Lokalisation und verschiedene Ausbildungsstufen sind aus der Abb. 20 zu ersehen.

Dieser Puff fehlt in jüngeren Larven nur selten vollkommen. Seine Größe verändert sich jedoch mehrfach im Verlaufe der Larvenzeit; durchschnittlich ist er in den ersten Tagen nach der letzten Larvenhäutung und in Vorpuppen am größten. In den Kontrollen zu diesen Versuchen, die altersmäßig zwischen den beiden Phasen liegen, gehört der Puff meistens den kleineren oder mittleren Größenklassen an (entsprechend Abb. 20 a—c, s. auch Abb. 22).

Durch verschiedene Außeninflüsse ist die Aktivität dieses Gens beeinflussbar. So fand BEERMANN (1952) früher, daß es auf Umsetzen der Larven aus niederer in höhere Zuchttemperatur mit besonders starker „Tröpfchenbildung“ reagiert. Auch in eigenen Transplantations- und Explantationsversuchen mit Speicheldrüsen, die von vorläufig noch unübersehbaren Puffbildungen begleitet sind, reagierte es besonders stark.

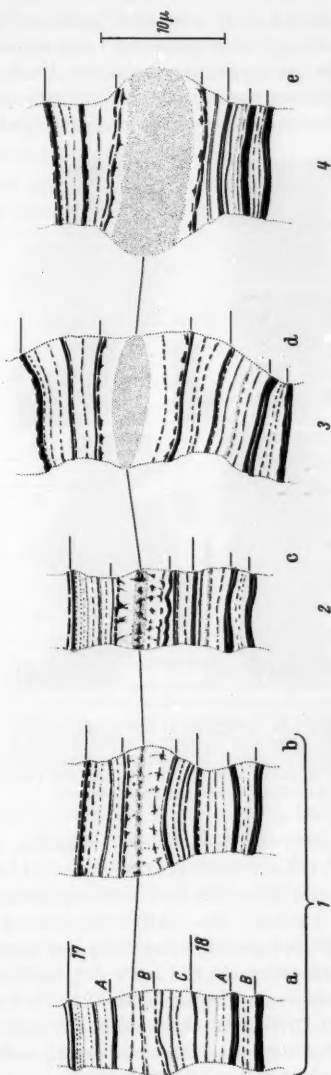


Abb. 20 a—e. Verschiedene Ausbildungsstufen des Puffs I-17-B. Die Ziffern unter den Chromosomen bezeichnen die Größenklassen a—c aus unbehandelten Kontrolltieren, d und e aus Larven, denen Ecdyson injiziert worden war

Das Gen I-17-B wird auch nach der Häutungseinleitung durch Ecdyson aktiviert und kann dann einen sehr großen Puff ausbilden (Abb. 21).

Da im Ausgangsmaterial der Versuche der Puff bereits vorhanden ist, müssen wieder die Häufigkeiten verglichen werden, mit denen er, bzw. seine verschiedenen Ausbildungsstadien, bei Versuchs- und Kon-

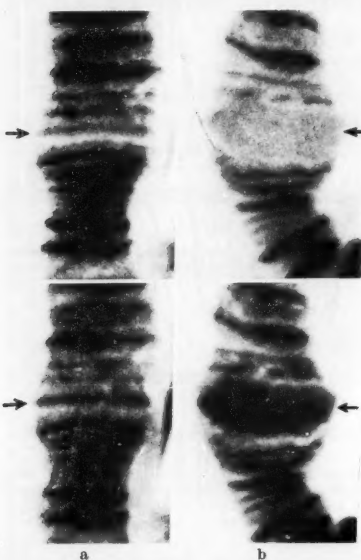


Abb. 21 a u. b. Abschnitte 17 und 18 des I. Chromosoms, oben mit Grünfilter, unten mit Rotfilter photographiert. a Unbehandelte Kontrolle, b nach Injektion von 45 CE Ecdyson. Der Puff I-17-B ist jeweils mit Pfeil markiert

trolltieren vorkommen. Die Puffs wurden daher wieder Größenklassen zugeteilt, die entsprechend den Angaben in Abb. 20 gewählt wurden. Da die Häufigkeit der verschiedenen Klassen in den Kontrollen der einzelnen Versuche nicht ganz gleich ist, ist den Versuchstieren in Abb. 22 und Tabelle 9 nur das jeweils zugehörige Kontrollmaterial gegenübergestellt. Die Häufigkeitsverteilung im Gesamtmaterial unterscheidet sich davon allerdings nicht wesentlich.

Es sollen zunächst nur die Versuche besprochen werden, in denen den Larven 45 CE Ecdyson injiziert wurden. Die erste Frage gilt wieder dem Beginn der Puff-Vergrößerung.

Bei den 12 Std und früher nach der Injektion fixierten Larven ist sicher kein Unterschied in der Häufigkeit der verschiedenen Puffgrößen gegenüber den Kontrollen vorhanden; deutlich und auffällig ist er dagegen bei den 18 Std danach fixierten (Abb. 22). Zeitlich verhalten sich auch die Tiere der hier nicht aufgeführten Versuche (s. unten) gleich oder ähnlich. Die Aktivitätserhöhung des Gens I-17-B dürfte also 15–17 Std nach der Injektion beginnen.

Spätestens 24 Std nach der Injektion ist das Maximum der Puff-Vergrößerung erreicht (Abb. 22). Es haben sich dann außerordentlich große Puffs entwickelt (Abb. 20e und 21b), die in ihrer Größe alle üblicherweise in jüngeren Larven auftretenden weit übertreffen. Es sind große Mengen des sich mit Lichtgrün bei  $pH$  5 anfärbenden Proteins angesammelt, die die feinere Chromosomenstruktur in dieser Region

verdecken, das Chromosom lokal stark aufblähen und dadurch die angrenzenden Abschnitte zusammendrücken. In manchen Präparaten ist das Protein nicht als kompakter Ballen zusammengeblieben, wie in den Abbildungen, sondern hat sich über ein längeres Stück des Chromosoms verteilt. Es ist allerdings möglich, daß es sich hierbei um Artefakte handelt, die beim Quetschen entstanden sind.

48 Std nach der Injektion ist die Aktivität des Gens I-17-B noch unverändert stark: von den fünf dann fixierten Tieren gehören drei der Klasse 4, und je eins den Klassen 2 und 3 an. Erst 72 Std nach der Injektion ist die Aktivität wieder auf den Stand der nicht in Metamorphose befindlichen Kontrollen zurückgefallen; die Puffs der dann fixierten Tiere gehören den Klassen 2 und 3 an.

In den Versuchen mit 45 CE Ecdyson waren mir die Vergrößerungen entwicklungs-spezifischer Puffs zuerst aufgefallen. Da sie zu einer Zeit erfolgen, in der die induzierte Aktivität der Gene I-18-C und IV-2-B nach Injektion kleinerer Hormondosen bereits wieder abnimmt, war zu prüfen, ob diese Hormondosen überhaupt noch eine Vergrößerung der entwicklungs-unspezifischen Puffs bewirken und in welcher Weise sie eventuell von der Konzentration des Ecdysons abhängt. Da die Zunahme der Puffgröße etwa 24 Std nach der Injektion beendet ist, läßt sich die Frage durch Vergleich der Puffgrößenhäufigkeiten in diesem Altersstadium untersuchen.

Tatsächlich sind große Puffs in den 24 Std nach der Injektion von 10 oder 15 CE Ecdyson fixierten Tieren häufiger, kleine Puffs seltener als in den Kontrollen. Zwischen den mit diesen beiden Dosen injizierten Versuchsgruppen war kein Unterschied erkennbar; in Abb. 22d sind daher die Puffgrößen-Häufigkeiten dieser beiden Gruppen zusammengefaßt dargestellt. Die Aktivierung des Gens I-17-B erfolgt also mit allen hier verwendeten Hormondosen.

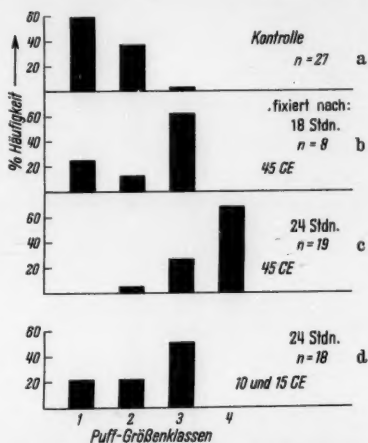


Abb. 22a—d. Häufigkeiten der Größenklassen des Puffs I-17-B unter verschiedenen Versuchsbedingungen, a—c zur Demonstration der zeitlichen Veränderungen der Puffgröße, c und d zur Demonstration des Einflusses der Hormondosis auf die Größe des voll ausgebildeten Puffs

Die injizierte Hormonmenge hat aber Einfluß auf die induzierte Puffgröße wie der Vergleich der Diagramme Abb. 22c und d zeigt. Die extrem großen Puffs, wie sie in den Abb. 20e und 21 dargestellt sind, treten nur nach Injektion der hohen Ecdysondosen auf. Bezogen auf die Stoffwechselprozesse, an denen das Gen beteiligt ist, bedeutet dieser Einfluß der Dosis auf die Puffgröße, daß die Menge des injizierten Hormons auch die Intensität solcher Teile des Zellstoffwechsels beeinflußt, die *nicht für Entwicklungsprozesse spezifisch* sind.

Wir fanden bei der Besprechung des Verhaltens der Gene I-18-C und IV-2-B, daß diese Gene durch das Ecdyson nicht nur aktiviert werden, sondern daß die induzierte Aktivität auch nur solange erhalten

Tabelle 9. *Größe des Puffs I-17-B in Tieren, in denen die früh induzierten Puffs I-18-C und IV-2-B bereits wieder rückgebildet sind*

| Injizierte Dosis    | Fixiert Std nach Injektion | % Tiere in Größenklasse |      |      |   | n  |
|---------------------|----------------------------|-------------------------|------|------|---|----|
|                     |                            | 1                       | 2    | 3    | 4 |    |
| 10 CE               | 24                         | 12,5                    | 25   | 62,5 | — | 8  |
| 15 CE               | 48                         | 20                      | 20   | 60   | — | 5  |
| Kontrolle . . . . . |                            | 68,8                    | 29,1 | 2,1  | — | 48 |

bleibt, wie Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist. Ist auch die erhöhte Aktivität der entwicklungsunspezifischen Puffs davon abhängig, daß Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist, bzw. daß unmittelbar durch das Ecdyson gelenkte Prozesse noch im Gange sind?

Diese Frage läßt sich an den Tieren prüfen, die fixiert wurden, nachdem das Hormon wieder verschwunden ist und die zuerst aktivierten Gene wieder inaktiv geworden sind. Das ist nach dem übereinstimmenden Verhalten der Gene I-18-C und IV-2-B 24 Std nach der Injektion von 10 CE und 48 Std nach der Injektion von 15 CE Ecdyson der Fall (s. Abb. 9 und 15). In Tabelle 9 ist die Häufigkeit der verschiedenen Größen des Puffs I-17-B in diesen beiden Altersgruppen zusammengestellt. In beiden Fällen überdauert also die erhöhte Aktivität dieses Gens die Aktivität der früh induzierten und hormonempfindlichen Gene, also auch die Anwesenheit des Hormons (vgl. S. 623). Diese Gene mit entwicklungsunspezifischen Puffbildungen werden also infolge der durch das Ecdyson ausgelösten Entwicklungsprozesse zwar zu erhöhter Aktivität angeregt, behalten jedoch diese erhöhte Aktivität auch dann noch bei, wenn der primäre Induktor der Entwicklungsprozesse wieder verschwunden ist. Der *induzierte Aktivitätsgrad ist nicht von seiner Gegenwart abhängig*. Verglichen mit den früh aktivierten Genen zeigt sich hier ein grundsätzlicher Unterschied im Verhalten gegenüber dem Ecdyson.

Es wurde schon zu Beginn des Kapitels bemerkt, daß eine größere Anzahl entwicklungsunspezifischer Puffs, die über alle Chromosomen verteilt sind, durch das Ecdyson eine zusätzliche Aktivierung erfährt. Die Beschreibung des Gens I-17-B konnte als Beispiel gelten, da sie sich grundsätzlich gleich verhalten. In Einzelheiten ihres Verhaltens weichen sie freilich voneinander ab, so in der Dauer ihrer Aktivitätserhöhung und dem Beginn ihrer Aktivierung. Während die Mehrzahl von ihnen etwa gleichzeitig mit dem Puff I-17-B zwischen 15 und 20 Std nach der Injektion zuerst eine erhöhte Aktivität zeigt, beginnen einige bereits früher sich auffällig zu vergrößern.

Das Gen dieser Gruppe, dessen Aktivitätserhöhung bisher am frühesten nach der Injektion festgestellt wurde, liegt im Abschnitt 3-A des I. Chromosoms (vgl. Abb. 23 a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, Pfeile). Es liegt hier an einer für die Untersuchung häufig sehr ungünstigen Stelle in einer Inversionschleife, so daß der Puff nur in einem Teil der Präparate gut beurteilt werden konnte. Auch dieser Puff kann in jungen Larven in sehr verschiedener Größe auftreten; er fehlt jedoch viel häufiger als der soeben besprochene im Abschnitt I-17-B; seine Maximalgröße ist außerdem geringer. In den Kontrollen besaßen ihn etwa 25% der Tiere.

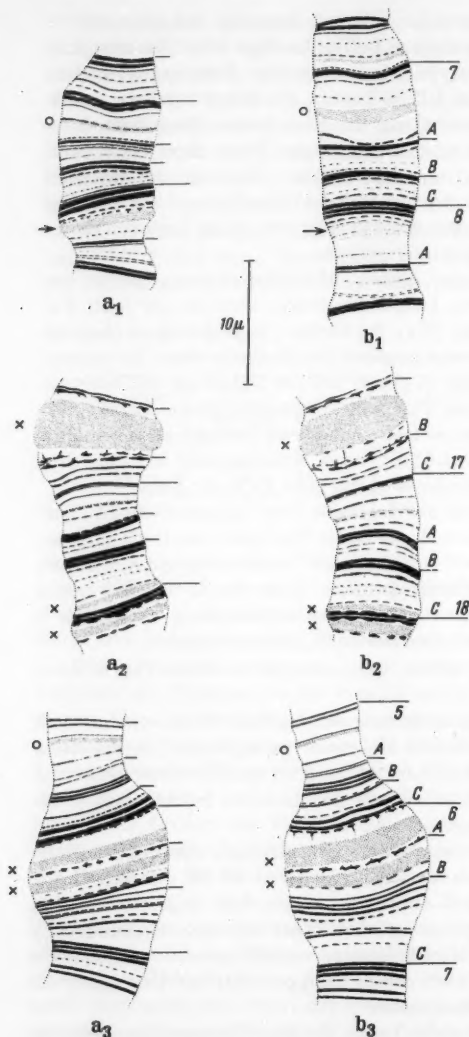
Spätestens 12 Std nach der Injektion des Ecdysons ist der Puff I-8-A voll ausgebildet. Unterschiede in der Häufigkeit des Puffs bzw. der Puffgrößen, gegenüber den Kontrollen sind bereits bei 6 und 8 Std nach der Injektion fixierten Tieren deutlich, noch früher fixierte zeigen dagegen keinen Unterschied. Die Aktivitätserhöhung dieses Gens dürfte also etwa 5 Std nach der Hormoninjektion beginnen.

Auch die Aktivierung dieses Gens erfolgte bei allen verwendeten Hormondosen.

Die Dauer der Aktivitätserhöhung des Gens I-8-A im experimentell induzierten Häutungsgeschehen ist etwas geringer als die des Gens I-17-B; 48 Std nach der Injektion ist der Puff auch bei einer Dosis von 45 CE häufig wieder rückgebildet. 24 Std nach der Injektion ist er dagegen unter diesen Bedingungen voll aktiv.

Die Aktivierung der Gruppe der entwicklungsunspezifischen Puffs erfolgte, mindestens nach der Injektion von 45 CE, in sämtlichen Tieren, bei denen an der Reaktion der beiden früh reagierenden Gene I-18-C und IV-2-B erkennbar ist, daß überhaupt eine Reaktionsfolge durch das Ecdyson eingeleitet worden ist. Auffälligerweise gilt das aber nicht für den *einzelnen* Puff dieser Gruppe. Das sei jetzt noch am Beispiel des Puffs I-8-A besprochen.

In Abb. 23 sind aus zwei Tieren je drei Chromosomenabschnitte dargestellt, in denen eine größere Anzahl der bisher besprochenen Puffs liegt: der Puff I-18-C und die entwicklungsunspezifischen Puffs I-8-A, I-17-B und I-19-A (Abb. 23 a<sub>1,2</sub>, b<sub>1,2</sub>); zusätzlich ist noch ein Stück



dem Tier in *b* ist diese Genreaktion als einzige ausgeblieben (Pfeile in *a*<sub>1</sub> und *b*<sub>1</sub>). Die mit (o) markierten Puffs sind entwicklungsspezifische mit langandauernden Aktivitätsphasen, welche nicht auf Ecdyson reagieren. *a*<sub>1</sub>, *b*<sub>1</sub>, *a*<sub>2</sub> und *b*<sub>2</sub>, Abschnitte des I., *a*<sub>3</sub> und *b*<sub>3</sub>, Abschnitte des II. Chromosoms

des II. Chromosoms abgebildet (Abb. 23 *a*<sub>3</sub>, *b*<sub>3</sub>), in dem in den Abschnitten 6-A und 6-B zwei entwicklungsspezifische Puffs liegen, die sich zeitlich sehr ähnlich verhalten wie der Puff I-17-B. Die Tiere stammen aus demselben Versuch und wurden 24 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson fixiert. In dem in Abb. 23a abgebildeten Tier zeigen sämtliche erwähnten Puffs den für diesen Abstand von der Injektion typischen Ausbildungszustand.

Auch in dem Tier in Abb. 23b haben, abgesehen von dem Puff I-8-A, alle anderen Puffs das typische Aussehen wie in Abb. 23a und zeigen damit, daß auch in diesem Tier das Ecdyson die in dieser Arbeit beschriebenen Reaktionen in Gang gesetzt hat. Der Puff I-8-A fehlt jedoch oder

Abb. 23. Chromosomenabschnitte aus zwei Tieren 24 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson. Die mit (x) markierten Puffs zeigen das für dieses Stadium typische Aussehen. Das Gen I-8-A hat nur bei dem Tier in *a* mit deutlicher Puffbildung reagiert, bei

ist höchstens ganz schwach entwickelt. Ein entsprechendes Ausnahmeverhalten zeigt dieses Gen auch in einzelnen Tieren anderer Versuchsgruppen, auch in solchen, die früher fixiert worden waren, so daß man als Grund für das Fehlen des Puffs bei dem in Abb. 23 b dargestellten Tier nicht annehmen kann, daß hier die Rückbildung etwa früher eingesetzt hätte als in den anderen Tieren.

Das Gen I-8-A steht mit diesem Verhalten nicht isoliert da. Ein ganz entsprechendes Ausbleiben der Puffbildung zeigen gelegentlich auch die anderen Gene dieser Gruppe bei völlig typischem Verhalten aller anderen. Es handelt sich also in all diesen Fällen nicht um das Ausbleiben der gesamten Ecdysonreaktion, auch nicht um ein Steckenbleiben der ausgelösten Entwicklung. Beides wird durch die Reaktion jeweils aller anderen Puffs sicher ausgeschlossen. Es handelt sich vielmehr um das *isolierte Ausbleiben der Reaktion eines einzelnen Gens in einem Entwicklungsgeschehen, für das seine erhöhte Aktivität typisch ist.*

Von 35 Tieren, die 12—24 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson fixiert wurden, war bei etwa einem Drittel die Reaktion eines der untersuchten entwicklungsunspezifischen Puffs ausgeblieben. Da bei sämtlichen 15 Tieren, die erst 48 oder 72 Std nach der Injektion fixiert wurden, die Metamorphose ohne Ausnahme weit vorangeschritten war (s. oben S. 611 und unten S. 663), ist zu folgern, daß das Ausbleiben der Reaktion eines der Gene mit entwicklungsunspezifischer Aktivität *kein Stehenbleiben der Entwicklung zur Folge* hat. Die Aktivität dieser Gene ist für das Entwicklungsgeschehen nicht unbedingt notwendig, zumindest nicht bei jedem Tier.

Die Auslösung des Entwicklungsgeschehens allein genügt nach diesen Befunden noch nicht, um die mit ihm gewöhnlich verbundene Intensitätserhöhung der Aktivität der Gene dieser Gruppe auszulösen. Man kann daraus jedoch noch nicht schließen, daß auch die Intensivierung der Stoffwechselprozesse, an denen diese Gene beteiligt sind, in solchen Fällen unterbleibt. Man könnte vielmehr daran denken, daß die Genaktivierungen dann ausbleiben, wenn die von ihnen gelieferte Information, bzw. ein Zwischenprodukt, an dessen Synthese sie mitwirken, ausreichend im Plasma vorhanden ist, so daß die Prozesse auch ohne zusätzliche gengesteuerte Enzymsynthese mit genügender Intensität ablaufen können. Wir haben hier wieder einen grundsätzlich ähnlichen Fall, daß nämlich die *Aktivierbarkeit des einzelnen Gens von dem physiologischen Zustand des Tieres abhängt*, wie wir ihn oben (S. 640) für das Gen IV-2-B kennenlernten.

Die Möglichkeit isolierten Ausfallens der Reaktion einzelner der Gene, deren Aktivität sich typischerweise im Verlaufe der durch das Ecdyson eingeleiteten Prozesse erhöht, zeigt weiter, daß sie nicht sämtlich an denselben Stoffwechselvorgängen beteiligt sind. Wenn trotz



des Ausfalls der besonders frühen Reaktion des Gens I-8-A die Aktivierung der anderen Gene erfolgt, so macht das besonders deutlich, daß aus einer zeitlichen Sequenz von Genaktivierungen nicht auf die Zugehörigkeit zu einer einzigen Reaktionskette geschlossen werden darf.

Bisher haben wir nur die Reaktionen von Genen mit längerer Aktivitätsdauer berücksichtigt. Im Abschnitt 8-A des III. Chromosoms kann ein kleiner Puff liegen, der in der Normalentwicklung nur hin und wieder auftritt. Dagegen ist er in fast allen Präparaten vorhanden, die von 12—18 Std nach der Injektion fixierten Tieren stammen. In früher und später fixierten fehlt er wieder gewöhnlich. Die Aktivitätsdauer dieses Gens in der experimentell ausgelösten Entwicklung ist also nur kurz und bestätigt damit, daß in selten auftretenden Puffs solche von Genen mit kurzer Aktivitätsdauer zu sehen sind.

Im Verlaufe der Vorpuppenphase kommt es außer zu den beschriebenen Genaktivierungen in Form von Puff-Neubildungen regelmäßig auch zur *Rückbildung* einer Reihe von Puffs, die während der ganzen Larvenzeit vorhanden waren. Rein formal gesehen handelt es sich bei solcher Beendigung der Tätigkeit eines Gens in einer bestimmten Entwicklungsphase natürlich um eine entwicklungspezifische Reaktion. Entwicklungsphysiologisches Interesse hat ein solches Erlöschen dann, wenn es kausal mit dem Aufrechterhalten — bzw. dem Ingangkommen — bestimmter Entwicklungsvorgänge verknüpft wäre; wir haben das ausführlich diskutiert (s. S. Kap. C3). Puffrückbildungen mit dieser Bedeutung sind jedoch bisher nicht bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich vielmehr bei diesen Puffrückbildungen um Inaktivierungen solcher Gene, die an entwicklungsunspezifischen, im einzelnen noch unbekannten Teilen des Stoffwechsels der Drüsenzellen beteiligt sind und die im Zusammenhang mit dem bevorstehenden Erlöschen der Speicheldrüsenfunktion erfolgen. Daß auch diese Beendigung von Genfunktionen, wie das gesamte Häutungsgeschehen, unter der Kontrolle der Metamorphosehormone geschieht, konnte PANITZ (1960) zeigen. Er löste die Rückbildung zellspezifischer Balbiani-Ringe in der Speicheldrüse von *Acricotopus lucidus*, die normalerweise im Verlaufe der Vorpuppenphase erfolgt (MECHELKE 1953, 1958), in Explantaten von larvalen Drüsen dadurch aus, daß er Gehirnkomplexe aus Puppen zu Larvenhämolymphe als Kulturmedium hinzufügte, oder Puppenhämolymphe als Kulturmedium verwendete.

##### 5. Spät aktivierte, vorpuppenspezifische Puffs

Während wir die oben beschriebene Aktivierung des entwicklungspezifisch reagierenden Gens I-18-C bereits in unseren ersten Versuchen fanden, glückte es lange Zeit nicht, weitere Puffs zu induzieren, von denen wir wußten, daß sie während des letzten Larvenstadiums nur in

der Vorpuppenphase vorkommen. Über die Sequenz ihres Auftretens in der Normalentwicklung wußten wir damals noch nichts. Inzwischen stellte sich heraus, daß übereinstimmend in der normalen und in der experimentell ausgelösten Metamorphose diese Gene im Gegensatz zu dem ihnen zunächst gleichgewichteten Gen I-18-C erst lange nach der Häutungseinleitung aktiv werden. Eine so lang andauernde Metamorphoseentwicklung erreichten wir aber nicht unter allen Versuchsbedingungen. In der Normalentwicklung untersuchten wir das Ver-

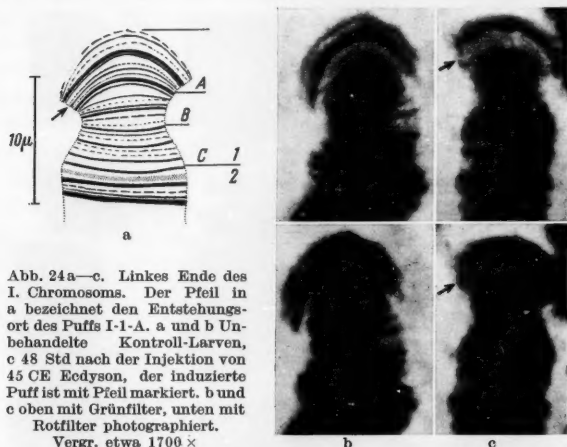


Abb. 24a—c. Linkes Ende des I. Chromosoms. Der Pfeil in a bezeichnet den Entstehungsort des Puffs I-1-A. a und b Unbehandelte Kontroll-Larven, c 48 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson, der induzierte Puff ist mit Pfeil markiert. b und c oben mit Grünfilter, unten mit Rotfilter photographiert.  
Vergr. etwa 1700 ×

halten von drei Puffs dieser Gruppe (s. Teil II). Innerhalb der hier untersuchten Zeitspanne — drei Tage nach der Hormoninjektion — treten zwei von ihnen auf.

Da uns aus der Untersuchung der Normalentwicklung keine vorpuppenspezifischen Puffs bekannt sind, die nur kurzfristig aktiv bleiben, konnten wir auch bei Fixierungen in längeren Zeitabständen sicher sein, eventuell auftretende vorpuppenspezifische Puffs zu erfassen. Die hier mitgeteilten Ergebnisse stützen sich auf 48 und 72 Std nach der Injektion fixierte Tiere.

Der eine der beiden untersuchten Puffs liegt ganz am linken Ende des I. Chromosoms im Abschnitt I-A (Abb. 24). Während der Larvenzeit, auch während der Häutungen, ist hier kein Puff ausgebildet (Abb. 24b). In der normalen Vorpuppenphase entsteht er als erster der auffälligen metamorphosespezifischen Puffs in Vorpuppen mittleren Alters und bleibt dann bis zum Zerfall der Drüse vorhanden.

Im Experiment ist der Puff in den 48 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson fixierten Tieren vorhanden (Abb. 24c). Er hat in diesen

Präparaten etwa die Größe des Puffs I-18-C bei stärkerer Ausbildung. In den 72 Std nach der Injektion fixierten Tieren ist er ebenfalls vorhanden, im Durchschnitt nur wenig größer als nach 48 Std. Die Größe, die er in sehr alten normalen Vorpuppen besitzt, erreichte er während der 72stündigen Dauer des Experiments nicht. Das stimmt gut mit dem noch jüngeren Entwicklungszustand der Versuchstiere überein.

Der zweite dieser Puffs liegt im *Abschnitt 14-A des II. Chromosoms* (Abb. 25a). Auch er tritt erst in Vorpuppen mittleren Alters auf, und

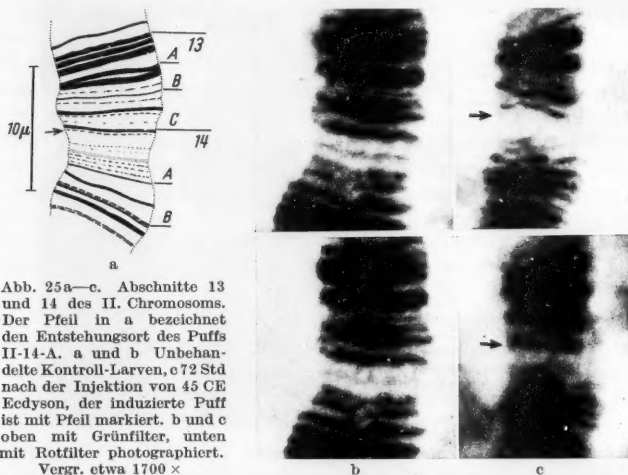


Abb. 25a—c. Abschnitte 13 und 14 des II. Chromosoms. Der Pfeil in a bezeichnet den Entstehungsort des Puffs II-14-A. a und b Unbehandelte Kontroll-Larven, c 72 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson, der induzierte Puff ist mit Pfeil markiert. b und c oben mit Grünfilter, unten mit Rotfilter photographiert. Vergr. etwa 1700  $\times$

zwar später als der im Abschnitt I-1-A gelegene. In der Larvenzeit vor Eintritt in die Metamorphose wurde wiederum bisher kein Puff an dieser Stelle des Chromosoms beobachtet (Abb. 25b).

Im Experiment ist dieser Puff in den 72 Std nach der Injektion von 45 CE Ecdyson fixierten Larven vorhanden (Abb. 25c), in den nach 48 Std und früher fixierten fehlt er. Die Größe des Puffs entspricht im Experiment etwa der des Puffs I-1-A. Auch er hat 72 Std nach der Injektion noch nicht die Größe des homologen Puffs in sehr alten Vorpuppen erreicht; er ist dann aber so groß wie in jüngeren Vorpuppen von etwa vergleichbarem physiologischem Alter.

Der *Beginn der Aktivierung* des Gens II-14-A läßt sich ungefähr erschließen. Da nämlich auch in der Normalentwicklung zwischen der Aktivierung der Gene I-1-A und II-14-A ein deutlicher, wenn auch zeitlich noch nicht exakt festlegbarer Abstand besteht, wird man an-

nehmen dürfen, daß die Aktivierung nicht allzu lange vor der Fixierung erfolgt ist. Dafür spricht noch ein weiteres Argument.

In der Normalentwicklung tritt nämlich außer den beiden soeben beschriebenen Puffs in älteren Vorpuppen noch ein weiterer im Abschnitt 9-B des III. Chromosoms auf. Er war in nahezu sämtlichen bisher untersuchten Vorpuppen ebenfalls vorhanden, in denen der Puff II-14-A ausgebildet war. Man muß daraus schließen, daß er etwa gleichzeitig mit diesem, wahrscheinlich etwas später, aktiviert wird. In den Experimenten wurde der Puff III-9-B nicht beobachtet<sup>1</sup>; in einigen der nach 72 Std fixierten Präparate ist möglicherweise eine ganz geringe Auflockerung vorhanden. Der Vergleich mit dem Verhalten in der Normalentwicklung weist also darauf hin, daß die Aktivierung des Puffs II-14-A im Experiment erst stattgefunden hat, kurz bevor er beobachtet wurde, d.h. also etwas früher als 72 Std nach der Injektion.

Die Aktivierungen der beiden Puffs I-1-A und II-14-A waren mit einer Dosis von 45 CE Ecdyson in sämtlichen 48 bzw. 72 Std nach der Injektion fixierten Larven ausgelöst worden.

Für die Frage der *Dosisabhängigkeit* dieser Genaktivierungen stehen aus unserem bisherigen Versuchsmaterial nur die 48 Std nach der Injektion von 15 CE Ecdyson fixierten Larven zum Vergleich zur Verfügung. In ihnen ist der Puff I-1-A, dessen Aktivierung dann bereits erfolgt sein mußte, nicht ausgebildet. Es ist danach zu vermuten, daß noch bei einer Injektion von 15 CE Ecdyson die induzierte Entwicklung endet, bevor die Prozesse beginnen, an denen die hier beschriebenen metamorphosespezifischen Puffs beteiligt sind. Da 48 Std nach der Injektion von 15 CE auch das Ecdyson wieder aus der Hämolymphe verschwunden ist, könnte das bedeuten, daß auch die späten metamorphosespezifischen Prozesse nur in Gang kommen, wenn Hormon vorhanden ist, bzw. wenn von ihm unmittelbar gesteuerte Prozesse, wie die Aktivitäten der Gene I-18-C und IV-2-B, ablaufen.

Metamorphosespezifische Puffs in Tieren, in denen das Gen I-18-C nicht aktiv war, wurden nicht beobachtet; das gleiche gilt für den Puff

<sup>1</sup> *Anmerkung bei der Korrektur:* In einem neuen Experiment wurden 7 Tieren 45 CE reines Ecdyson injiziert. Von 4 nach 72 Std fixierten Tieren besaßen je 2 den Puff I-18-C in den Größen 2 und 3. Alle 4 Tiere besaßen die Puffs I-1-A und II-14-A, eins außerdem den Puff III-9-B in starker, ein anderes in schwacher Ausbildung. Drei Tiere überlebten bis zum 4. Tag. Eins von ihnen hatte sich inzwischen verpuppt, die beiden anderen standen dicht davor und zeigten das für sehr alte Vorpuppen typische Puffmuster. Damit lassen sich jetzt folgende ergänzende bzw. bestätigende Aussagen machen: 1. mit 45 CE Ecdyson wird die vollständige Verpuppung ausgelöst; 2. der Anstieg der Kurve III in Abb. 9 72 Std nach der Injektion ist real; 3. auch der Puff III-9-B tritt im experimentell induzierten Metamorphosesgeschehen auf, und zwar offenbar wenig später als 72 Std nach der Injektion.

I-1-A auch hinsichtlich des Gens IV-2-B. Bei der Aktivierung des Gens II-14-A 72 Std nach der Injektion war dagegen die verstärkte Aktivität des Gens IV-2-B bereits wieder erloschen (s. Abb. 15); in der Normalentwicklung können auch beide zugleich stark aktiv sein. Die Möglichkeit, daß zwischen die primäre Ecdysonwirkung und die Aktivierung der metamorphosespezifischen Puffs die frühen Genreaktionen eingeschaltet sind, besteht also durchaus; unsere Befunde stünden weiterhin mit der Hypothese in Einklang, daß diese Genaktivierungen unter der Kontrolle des Gens I-18-C erfolgen.

#### 6. Nicht-reagierende puffbildende Gene

Die Untersuchung des Verhaltens der verschiedenen Puffs in der Normalentwicklung von *Chironomus* führte zu der Unterscheidung von entwicklungsspezifischen und entwicklungsunspezifischen Genreaktionen (s. Teil II). Bei *Drosophila* sind, nach den Untersuchungen von BECKER (1959), Puffs unmittelbar vor den Häutungen besonders zahlreich, so daß BECKER dort direkt von „puffing“-Perioden sprechen und die Puffbildung als eine rhythmische, beim Übergang von einem Entwicklungsstadium in das nächste auftretende Erscheinung auffassen konnte. Von solchen Unterschieden in der Puffhäufigkeit in jungen Larven und Vorpuppen kann bei *Chironomus* jedoch keine Rede sein. Als Ergebnis dieser Arbeit stellte sich nun heraus, 1. daß erwartungsgemäß die Gene mit entwicklungsspezifischer Reaktion auch im experimentell ausgelösten Häutungsgeschehen aktiviert werden, 2. daß aber auch entwicklungsunspezifische Puffs aktiviert werden. Im Experiment läßt sich bei *Chironomus* das Verhalten der Puffs besser beurteilen als in der Normalentwicklung. Sollte sich nun herausstellen, daß auch hier alle oder fast alle puffbildenden Gene aktiviert werden, so würde das zwischen den Befunden über das Normalverhalten bei *Chironomus* und *Drosophila* vermitteln. Bei der Mehrzahl der Puffs in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* wurde jedoch auch nach Ecdysoninjektion keine Reaktion beobachtet.

Nun unterscheiden sich die puffbildenden Gene in der Dauer ihrer durchschnittlichen Aktivitätsphasen. Je länger die Aktivitätsdauer eines Gens ist, umso häufiger wird man es in willkürlich herausgegriffenen Proben als Puff antreffen. Umgekehrt läßt sich bei Genen mit kurzen Aktivitätsphasen aus dem Nichtbeobachten eines Puffs nur dann auf völlig fehlende Aktivierung unter bestimmten Bedingungen schließen, wenn in kurzen Zeitabständen nach dem experimentellen Eingriff untersucht wurde, während bei Genen mit längeren Aktivitätsphasen auch bei größeren Zeitabständen der einzelnen Prüfungen sichere Aussagen möglich sind. Um die negative Aussage, daß ein großer Teil der

Puffs in der Entwicklung keine Reaktion zeigt, an unserem Material machen zu können, ist man daher auf die Untersuchung von Puffs mit langdauernden Aktivitätsphasen angewiesen. Zu ihnen gehören zwei Puffs in den Abschnitten 2-A und 3-A des III. Chromosoms (Abb. 26). Sie sind fast immer vorhanden; ihre Aktivitätsgrade schwanken gewöhnlich nicht sehr stark. Im Versuchsmaterial sind diese Puffs in allen ihren Größen vorhanden; in einigen Tieren fehlen sie. Die Häufigkeit der verschiedenen Größen ist die gleiche wie bei unbehandelten Tieren. Die zu verschiedenen Zeiten nach der Hormoninjektion fixierten Tiere lassen keine Unterschiede erkennen.

Ebenso wie diese verhalten sich zahlreiche andere Puffs mit langdauernden Aktivitätsphasen, von denen einige in Abb. 23 angegeben sind.

Diese Befunde bestätigen und sichern also die Ergebnisse der Untersuchung der Normalentwicklung: es gibt zweifellos eine große Anzahl puffbildender Gene, auf deren Aktivitätsverhalten der Entwicklungszustand, in dem sich die Larve befindet, keinen Einfluß hat. Zu ihnen scheint sogar die Mehrzahl aller Puffs in den Speicheldrüsenchromosomen von *Ch. tentans* zu gehören, wenn auch auffälligerweise die größten zu den entwicklungsunspezifischen gehören, deren Aktivität durch Ecdyson erhöht wird.

Die auffälligsten Funktionsstrukturen in den Speicheldrüsenchromosomen sind die im IV. Chromosom gelegenen Balbiani-Ringe. Wir haben in ihnen Genorte mit besonders hoher Stoffwechselaktivität zu sehen. Die Balbiani-Ringe zeigen weder in der Normalentwicklung noch im Experiment irgendeine Veränderung ihrer Aktivität im Zusammenhang mit dem Entwicklungsgeschehen. Das steht gut mit der Vermutung BEERMANNs (1961) in Einklang, daß sie mit dem Funktionsstoffwechsel der Drüse, der Speichelproduktion, zu tun haben, indem sie eventuell unmittelbar die RNS für die Synthese der Speichelproteine liefern.

Faßt man alle heute bekannten Befunde zusammen, so läßt sich jetzt sicher sagen, daß die Puffbildung eines Teils der Gene in den Riesenchromosomen kein Phänomen ist, das schon an sich selbst an Entwicklungsprozesse gebunden wäre. Wieweit Entwicklungsprozesse an der Veränderung der Genaktivität beteiligt sind, muß vielmehr für jedes einzelne Gen jeweils gesondert untersucht werden.

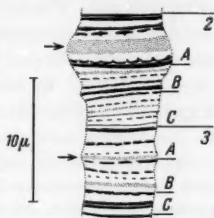


Abb. 26. Abschnitte 2 und 3 des III. Chromosoms mit zwei entwicklungsunspezifischen Puffs (Pfeile) mit langdauernden Aktivitätsphasen. Die Puffs zeigen keine mit der Häutung korrelierten Veränderungen

#### D. Die Genreaktionen und das Entwicklungsgeschehen in der Metamorphose

Durch das injizierte Ecdyson werden in unseren Versuchen die für die Puppenhäutung typischen Entwicklungsprozesse in jungen Larven ausgelöst. In den Speicheldrüsen folgen auf die Injektion eine Reihe von Genreaktionen, die sich im einzelnen in bestimmter Weise als abhängig von dem durch die Injektion geschaffenen hormonalen Milieu in der Larve erweisen. Die Gene, die im Experiment aktiviert werden, sind ausschließlich solche, die auch im normalen Metamorphosegeschehen entsprechende Veränderungen ihrer Aktivität zeigen. Andererseits wurden alle Genreaktionen, die aus den entsprechenden Abschnitten der normalen Vorpuppenentwicklung bekannt sind, auch im Experiment ausgelöst. Es ist also berechtigt, die im Experiment gefundenen Ergebnisse auf die Häutungsauslösung durch das larveneigene Ecdyson in der Normalentwicklung zu übertragen.

In einigen Einzelheiten, vor allem der Stärke der ausgelösten Genreaktionen, sind Unterschiede im Verhalten einzelner Gene in Normalentwicklung und im Experiment vorhanden. Sie lassen sich auf Unterschiede in den Auslösebedingungen zurückführen und ändern nichts an der grundsätzlichen Übereinstimmung. Nachdem in Teil II das Genverhalten in der Normalentwicklung dargestellt sein wird, wird darauf noch kurz eingegangen werden. Das Ausnahmeverhalten des Gens I-19-A wurde oben (S. 651) ausführlich besprochen.

Im Gegensatz zur Normalentwicklung ist im Experiment der Zeitpunkt der Entwicklungsauslösung im einzelnen Versuchstier genau bekannt. Es zeigte sich, daß nach der Häutungsinduktion durch das Ecdyson in der Zelle *Genreaktionen in einer bestimmten zeitlichen Sequenz* ablaufen: Als erstes ist die Aktivierung des Gens I-18-C 15 bis 30 min nach der Injektion erkennbar. Dann wird, zwischen 30 und 60 min nach der Injektion, die Aktivität des Gens IV-2-B erhöht. In den nächsten 15–20 Std folgen eine ganze Reihe von Aktivitätserhöhungen weiterer Gene: I-8-A (etwa 5 Std), III-8-A (10–12 Std), I-19-A (12 bis 15 Std), I-17-B, II-6-A, II-6-B (15–18 Std nach der Injektion) und andere. 48 und 72 Std nach der Injektion schließlich werden die Gene I-1-A und II-14-A aktiv. Diese Genreaktionen kann man zu *drei Gruppen* zusammenfassen, die sich außer im Zeitpunkt vor allem in der Art ihrer Reaktion auf das Hormon unterscheiden: 1. die früh reagierenden Gene I-18-C und IV-2-B, 2. die entwicklungsunspezifischen Puffs, die zwischen 5 und 20 Std nach der Injektion aktiviert werden, 3. die spät aktivierten Gene.

Die Spezifität ihrer Reaktion, die streng an Entwicklungsphasen gebunden ist, in denen Ecdyson in der Hämolymphe vorkommt, dann aber regelmäßig eintritt, und deren frühes Einsetzen nach der Injektion zeichnen die beiden *Gene der 1. Gruppe* bereits den anderen gegenüber aus. Gemeinsam ist den beiden Genen weiter, daß ihre entwicklungs-



spezifischen Reaktionen nur gerade so lange andauern, wie Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist, und in ihrer Intensität vom Hormontiter beeinflußt werden. Aus dieser engen Korrelation zwischen dem Ecdyson und bestimmten Aktivitätszuständen dieser beiden Gene muß man schließen, daß sie an der *Übertragung der hormonalen Information auf die Zelle und an der quantitativen Regulation der induzierten Prozesse* beteiligt sind.

Nun ist nach den Untersuchungen verschiedener Autoren (KÜHN und PIEPHO 1938, KETCHELL und WILLIAMS 1953, u.a.) die Wirkung des Ecdysons kein bloßer Anstoßeffect, sondern für das Zustandekommen der vollständigen normalen Entwicklung ist seine längere Wirksamkeit nötig. Unsere Befunde deuten darauf hin, daß diese Wirkung des Ecdysons in einer langandauernden Regulation bestimmter, an die Beteiligung von Genen gebundener Teile des Zellstoffwechsels besteht.

Will man die Stellung der beiden Gene im frühen Häutungsgeschehen gegeneinander abwägen, so sprechen eine Anzahl Argumente dafür, daß die Reaktion des Gens I-18-C der Häutungsinduktion selbst näher steht als die des Gens IV-2-B: So unterscheidet sich das Gen IV-2-B von dem Gen I-18-C bereits durch den etwas späteren Beginn seiner Reaktion, was in der Normalentwicklung noch deutlicher ist als im Experiment. Beim Ausfall einer der beiden Genreaktionen zeigte sich ferner, daß eine eventuelle Abhängigkeitsbeziehung zwischen den beiden Genen höchstens derart sein kann, daß die Reaktion des Gens I-18-C die primäre ist. Das Gen IV-2-B scheint schließlich seine erhöhte Aktivität schon verlieren zu können, wenn noch Ecdyson in der Hämolymphe vorhanden ist; wenn also seine erhöhte Aktivität einerseits die Gegenwart von Ecdyson voraussetzt, so scheint sie andererseits doch auch noch von anderen Faktoren beeinflußt zu werden. Hierin liegt bereits eine Ähnlichkeit im Verhalten mit der Gruppe der entwicklungsunspezifischen Puffs. Berücksichtigt man schließlich noch, daß er auch in jungen Larven eine geringe Aktivität hat, so wird man schließen können, daß der Puff IV-2-B zu einem *grundsätzlich ständig ablaufenden*, also *entwicklungsunspezifischen* Teil des Zellstoffwechsels gehört, der allerdings im Häutungsgeschehen von besonderer Wichtigkeit ist und daher hier als einer der ersten zusätzlich intensiviert wird.

Das Gen I-18-C zeichnet sich, wenn unsere Deutung zutrifft, allen anderen untersuchten Genen gegenüber vor allem dadurch aus, daß seine Aktivität *notwendig* mit dem Vorhandensein von Ecdyson in der Hämolymphe verbunden ist. Damit stimmt überein, daß seine Reaktion bereits sehr bald nach dem Eindringen des Hormons in die Zelle beginnt. Unsere Befunde widersprechen auch der Möglichkeit nicht, daß die Beeinflussung aller übrigen Entwicklungsprozesse durch das Ecdyson

vermittels der Reaktion dieses Gens geschieht. Man wird schließen müssen, daß es dem *Induktionsvorgang selbst* sehr nahe steht.

Die *Gene der 2. Gruppe* zeigen bereits durch ihre relativ spät erfolgende Aktivierung, daß sie nicht an der Induktion selbst beteiligt sind. Sie sind darüber hinaus jedoch überhaupt nicht an entwicklungs-spezifischen Teilen des Zellstoffwechsels beteiligt. Aber auch dann, wenn ihre Aktivierung infolge von Entwicklungsprozessen erfolgt ist, sind sie von ihnen noch relativ unabhängig: sie können auch dann noch eine Zeitlang weiterlaufen, wenn das Hormon wieder aus der Hämolymphe verschwunden ist, wenn zumindest die das Entwicklungs-geschehen lenkenden Prozesse wieder zum Stillstand gekommen sind und auch neue Entwicklungsvorgänge, wie die Aktivierung der Gene I-1-A und II-14-A, nicht mehr einsetzen; der Entwicklungsbeginn ist noch keine hinreichende Bedingung für ihre Aktivierung; und schließlich hat ihr Inaktivbleiben keinen Entwicklungsstillstand zur Folge. Das Verhalten dieser Gruppe Gene im Experiment zeigt uns aber, daß auch *entwicklungunspezifische Teile des Zellstoffwechsels in Phasen neu eingeleiteter Entwicklung unter Beteiligung des Genoms aktiviert* werden und geben uns Hinweise über den *zeitlichen Verlauf* dieser Aktivierungen.

Nicht-entwicklungsspezifische Teile des Zellstoffwechsels könnten solche des *Funktionsstoffwechsels* der Drüsenzellen sein, sie könnten aber auch dem allgemeineren Bau- oder Betriebsstoffwechsel der Zelle, ihrem *Grundstoffwechsel* angehören. Welchen von beiden die einzelnen hier untersuchten Genreaktionen der Gruppe 2 zugehören, muß zunächst offenbleiben, beides erscheint möglich. Soweit allerdings die Hormondosis einen Einfluß auf die Intensität dieser Genreaktionen hat, wäre es eher verständlich, wenn solche Gene am Grundstoffwechsel der Zelle beteiligt wären. Daß Teile des Grundstoffwechsels der Zelle in der Entwicklung besondere Intensität erhalten können, ist bekannt, da sie, wie etwa die energieliefernden Prozesse, die Voraussetzung auch für die eigentlichen Entwicklungsvorgänge liefern. Sie sind ein Zeichen für erhöhte Aktivität der Zelle überhaupt, unabhängig davon, aus welchem Grund die Zelle jeweils besonders stark aktiv ist. Je intensiver aber der eingeleitete Prozeß ist, umso intensiver wird auch dieser Teil des Zellstoffwechsels sein.

Die spät aktivierten *Gene der Gruppe 3* schließlich haben sicher ebenfalls nichts mehr mit der Induktion zur Häutung zu tun, ihre Reaktionen sind aber entwicklungsspezifisch. Auf das Hormon und auf die von ihm zuerst eingeleiteten Prozesse reagieren sie sicher nicht unmittelbar. Das ist schon daran deutlich, daß sie, im Gegensatz zu den Genen I-18-C und IV-2-B, nicht in Larvenhäutungen aktiv werden, also weder immer wenn Ecdyson vorhanden ist, noch immer wenn diese Gene aktiv sind. Andererseits ist aber doch das Vorhandensein des Ecdysons

und die Aktivität der früh reagierenden Gene — wenigstens des Gens I-18-C — wahrscheinlich Voraussetzung für ihre Aktivierung. Wenn also die später einsetzenden Entwicklungsprozesse auch nicht unmittelbar vom Ecdyson selbst ausgelöst werden, so scheint auch ihre Auslösung doch in irgendeiner Weise unter seiner Kontrolle zu stehen. Vielleicht bietet das hier beschriebene System aktiver Gene ein günstiges Objekt, um die Probleme, die sich hier abzeichnen, über die Lenkung des einmal induzierten Prozesses, einer Lösung näher zu führen.

Die Gene der 3. Gruppe sind sicher an Stoffwechselvorgängen der Zelle beteiligt, die streng spezifisch für die Metamorphose sind. Daß sie erst relativ spät aktiviert werden, mag damit zusammenhängen, daß die Drüsenzellen überhaupt erst sehr spät ihre spezifische Metamorphoseleistung vollbringen: sie werden unmittelbar vor der Puppenhäutung im engeren Sinne histolysiert. Man kann sicher nicht verallgemeinernd sagen, daß die metamorphosespezifischen Gene immer erst so spät, immer erst später als die entwicklungsunspezifischen Teile des Stoffwechsels aktiviert würden. Die Zeit des Beginns dieser verschiedenen Arten von Prozessen ist zweifellos gewebespezifisch.

*Reaktionen verschiedener Gewebe nach der Einleitung der Häutung* sind aus Untersuchungen mehrerer Autoren bekannt. Die Frage, die dort wie bei uns zunächst im Mittelpunkt des Interesses stand, ist die nach dem Mechanismus der Induktion selbst.

Die alte Hypothese von WILLIAMS (1951), daß Ruhezustände der Entwicklung darauf beruhten, daß das Cytochromsystem nicht für die Zellatmung zur Verfügung stehe und die Entwicklungsauslösung durch das Ecdyson über die Anregung der Cytochrom-c-Synthese und Restaurierung des Cytochrom-Atmungssystems gehe, wird heute wohl allgemein abgelehnt (s. WIGGLESWORTH 1957, KARLSON 1959). Nach KURLAND und SCHNEIDERMAN (1959) beruht die Unempfindlichkeit der Diapausepuppen von *Platysamia* gegen Kohlenmonoxyd auf einem Überschuß der Cytochromoxydase gegenüber dem Cytochrom c. Nach Beendigung der Diapause steigt sehr bald der relative Anteil am Cytochrom c wieder an, möglicherweise durch adaptive Synthese als Antwort auf Veränderungen im Energiebedarf der Gewebe. Diese Veränderungen im Energiebedarf sind es, wie KURLAND und SCHNEIDERMAN meinen, die im Falle der Diapausebeendigung durch das Ecdyson induziert werden. Durch lokale Wundsetzung in der Epidermis wird das Cytochrom-Atmungssystem ebenfalls reaktiviert. Daß das Cytochromsystem gerade im Entwicklungsgeschehen von besonderer Bedeutung ist, und seine Vergiftung zum Entwicklungsstillstand führt, konnten WILLIAMS u. Mitarb. früher zeigen (s. z.B. WILLIAMS 1951, SCHNEIDERMAN und WILLIAMS 1954). In einigen Fällen scheint das Cytochromsystem auch in Ruhephasen der Entwicklung aktiv zu sein (MACDONALD

und BROWN 1952, LUDWIG 1953), wenn auch eventuell in stark verminderter Stärke (SLAMA 1960). Bei *Chironomus plumosus* sind in Larven geringe Mengen Cytochromoxydase vorhanden, sie nimmt in Vorpuppen etwas zu und erreicht in Puppen und Imagines sehr hohe Werte (AUGENFELD und NEES 1961). *Chironomus tentans*-Larven des Alters, in dem wir injizierten, sind empfindlich gegenüber Kohlenmonoxyd. Auch nach den Untersuchungen von WILLIAMS ist das Cytochromsystem in wachsenden *Platysamia*-Larven intakt. Ob die Cytochromatmung bei *Chironomus* nach der Metamorphoseauslösung intensiviert wird, ist noch zu prüfen; nach den zitierten Untersuchungen von WILLIAMS und von SCHNEIDERMAN wäre es zu erwarten. Das Verhalten des Cytochromsystems der Zellatmung stellt also ein sehr gutes Beispiel für das dar, was wir oben als *Intensivierung eines entwicklungsunspezifischen Teils des Grundstoffwechsels beim Beginn von Entwicklungsvorgängen* aus dem Verhalten der Gene der Gruppe 2 ableiteten.

Zell- und entwicklungspezifische Teile des Zellstoffwechsels können ebenfalls ziemlich früh nach der Häutungseinleitung in Gang kommen. So fand KARLSON (1959), daß der mit der Pupariumbildung verbundene Tyrosin-Einbau in die Kutikula bei *Calliphora* 15–20 Std nach der Injektion des Ecdysons beginnt. KARLSON nimmt an, daß durch das Hormon über irgendwelche noch unbekannte, vielleicht an Zellstrukturen gebundene, vorangehende Prozesse die Tyrosinase aktiviert wird. Wir würden hier an Genwirkungen zu denken haben.

WIGGLESWORTH (1957) sieht den entscheidenden Defekt in ruhenden Larven im Fehlen der Eiweißsynthese, und er meint, daß die Ankurbelung der Proteinsynthese die entwicklungsauslösende Wirkung des Ecdysons sei. Seine Annahme stützt er auf Befunde an verschiedenen Geweben von *Rhodnius* (Fettkörper, Epidermis, Muskulatur), die besonders intensiven Stoffwechsel nach der Häutungseinleitung zeigen. In ihnen allen vergrößern sich einige Stunden nach der Hormoninjektion der Nukleolus und die Mitochondrien, und RNS und Protein nehmen zu. Wir haben die Untersuchungen von WIGGLESWORTH an *Chironomus* wiederholt und konnten sie zum Teil für den Fettkörper bestätigen; die Mitochondrien quellen hier etwa 24 Std nach der Injektion sehr stark. Keinesfalls ist diese Erscheinung jedoch allen Geweben gemeinsam, die auf das Ecdyson mit Häutungsverhalten reagieren (CLEVER 1961 a). Auch die Ankurbelung des Proteinstoffwechsels ist nur *eine* der Häutungsreaktionen *eines Teils* der Gewebe.

Diese hier referierten Reaktionen der Zellen auf die Häutungsinduktion sind teils zellspezifisch, teils zellunspezifisch; teils sind sie entwicklungspezifisch, teils werden entwicklungsunspezifische Teile des Grundstoffwechsels aktiviert. Die Vorgänge sind also *grundsätzlich gleicher Art wie die, an denen wir bestimmte Gene beteiligt fanden*. Die

Reaktionen im Zellplasma beginnen im gleichen Zeitabschnitt, in dem wir den Beginn der Aktivitätserhöhung der entwicklungsunspezifischen Puffs fanden (s. CLEVER 1961a für genauen Vergleich). Nach allem, was wir über die Bedeutung von Genaktivitäten wissen, liegt diese vor allem darin, daß von hier aus vermittelt der RNS Enzymsynthesen gelenkt werden, die ihrerseits wieder für das Einsetzen weiterer Stoffwechselvorgänge verantwortlich sind. Soweit Enzymsynthesen im Plasma an der Zellreaktion auf Ecdyson beteiligt sind, darf man annehmen, daß die beobachteten *Genaktivierungen ihnen vorangehen*. WILLIAMS (1951), WIGGLESWORTH (1957) und KURLAND und SCHNEIDERMAN (1959) nehmen an, daß die Häutungseinleitung an den Beginn von Synthesevorgängen geknüpft ist, und WIGGLESWORTH (1960) selbst denkt an die Beteiligung von Genen bei diesen Prozessen. Durch die Häutungsinduktion wird ein Wechselspiel von Prozessen am Genom und im Plasma der reagierenden Zellen ausgelöst.

CLEVELAND u. Mitarb. (CLEVELAND 1959; CLEVELAND und BURKE 1960; CLEVELAND, BURKE und KARLSON 1960) fanden, daß der Ecdysonititer Einfluß auf die Sexualzyklen der parasitischen Protozoen in der Schabe *Cryptocercus* hat. Die Reaktionen dieser Protozoen ließen sich durch Injektion von Ecdyson Dosen auslösen, die noch keine Häutung der Schabe bewirkten. CLEVELAND sieht vor allem in dem Befund, daß er bei einigen Flagellaten-Arten bereits innerhalb weniger Stunden nach der Injektion Gametogenese auslösen konnte, einen Hinweis dafür, daß das Ecdyson auf die Protozoen direkt wirkt und nicht auf dem Umweg über den Wirtsorganismus. Eine Stütze für diese Hypothese liegt seiner Meinung nach weiter darin, daß sich auch in adulten Schaben, die keine eigene Prothoraxdrüse mehr haben und die nicht mit Häutung reagierten, durch Ecdysoninjektion Gametogenese bei den Flagellaten auslösen ließ.

Nun zeigen unsere Befunde aber, daß gerade die entscheidenden hormonempfindlichen Genreaktionen bereits in Gang sind, wenn CLEVELAND die Reaktion der Flagellaten zuerst beobachtete. Gerade diese Genreaktionen werden außerdem auch mit Hormondosen induziert, die noch keine weiteren Häutungsprozesse auslösen, und es ist zunächst nicht einzusehen, daß sie nicht auch in adulten Insekten ebenso ausgelöst werden könnten, wenn auch gewöhnlich nicht werden. Man wird die Frage einer direkten oder indirekten Wirkung des Ecdysons auf die Protozoen daher vorläufig offenlassen müssen. Sicherlich lassen sich aber in beiden Fällen interessante Hypothesen und Folgerungen aus der Reaktion so verschiedener Tiergruppen auf dasselbe Hormon ableiten.

*Wo greift das Hormon selbst an?* Die meisten der bisher beschriebenen Effekte können schon aus rein zeitlichen Gründen erst Folgewirkungen sein. WIGGLESWORTH (1957) denkt daran, daß das Ecdyson durch Erhöhung der Permeabilität von Zellstrukturen Enzymreaktionen im Plasma in Gang brächte. Aber selbst beim Insulin mit seiner viel einheitlicheren Wirkung, für das ein Mechanismus dieser Art zuerst angenommen worden ist, versucht man jetzt, die Spezifität der eingeleiteten Prozesse durch komplizierende Zusatzannahmen zu erklären (s. HECHTER und LESTER 1960).

Es scheint so, als würde durch das Ecdyson zunächst in allen Geweben der gleiche, *hormonspezifische* Prozeß ausgelöst und als kämen erst *nach ihm* die *gewebespezifischen* Häutungsprozesse der einzelnen Zellarten in Gang. An dem hormonspezifischen Primärprozeß ist nach unseren Befunden das Gen I-18-C beteiligt. Man kann nun die Hypothese machen, daß die *Primärwirkung des Ecdysons darin besteht, daß es Veränderungen in der Aktivität eines oder weniger spezifischer Genloci auslöst* und daß über diese Genreaktionen erst das weitere Geschehen in Gang gebracht wird (CLEVER und KARLSON 1960). Ein solches Gen könnte bei *Chironomus* das im Abschnitt 18-C des I. Chromosoms gelegene sein; jedenfalls stünden unsere bisherigen Befunde damit nicht in Widerspruch. Die Hypothese gibt einerseits eine ganz neue Möglichkeit, zum Verständnis der Wirkungsweise von Hormonen und anderen als Induktoren wirksamen Stoffen im Entwicklungsgeschehen zu kommen; andererseits läge dann hier zum erstenmal ein physiologisch definierter Stoff vor, der eine Genaktivierung bewirkt, und es böte sich damit ein Ansatzpunkt, an das Problem des Mechanismus der Genaktivierung selbst heranzukommen. Ob die Hypothese zutrifft, oder ob nicht der Genreaktion doch noch Veränderungen im Chemismus der Zelle vorangehen, die dann ihrerseits diese Aktivierung bewirken, muß die weitere Untersuchung lehren. Jede künftige Überlegung wird jedenfalls berücksichtigen müssen, daß *als erstes durch das Ecdyson nur wenige und sehr spezifische Vorgänge in ganz bestimmter zeitlicher Sequenz ausgelöst werden, und daß zu den frühesten Prozessen bereits die Aktivierung ganz spezifischer Gene gehört*. Diese Spezifität der Primärprozesse dürfte durch die Annahme so allgemeiner Reaktionen wie Veränderungen der Permeabilität von Zellstrukturen kaum zu erklären sein.

### Summary

1. Injection of the prothoracic gland hormone, ecdysone, causes the pupal moult in young *Chironomus tentans* larvae of the final instar. The relationship between the induced metamorphosis and the correlated changes in gene activities in the salivary gland chromosomes is the subject of this paper.

2. As the first recognizable reaction a new puff appears 15–30 min after the injection in the region I-18-C. Two hours after the injection the enlargement of the puff has ceased. The induced puff is on the average larger after high hormone doses than after low. If one injects more ecdysone into young prepupae the size of the puff already present increases. The size of the puff, as a measure of gene activity, is therefore influenced by the hormone concentration in the hemolymph. 24 hours after injection of 10 *Calliphora* units (CU) of ecdysone the induced puff has again disappeared. After injection of 15 CU it has become smaller after 24 hours, but does not completely regress until



after 48 hrs. After injection of 45 CU the size of the puff decreases a little in the first 24 hours, then remains the same or even begins to enlarge again. In this case the typical prepupal condition of the puff is attained. — The homologous bands in section I-18-C of both *C. tentans* and *C. pallidivittatus* react identically.

3. Between 30 and 60 minutes after the injection a gene in section IV-2-B begins to increase its activity. In this case maximal puffing is reached somewhat more than 2 hrs. after the injection and with all doses used in these experiments. 24 hrs. after the injection of 10 CU of ecdysone the puff has regressed; when 15 CU are used, regression is complete after 48 hrs. The temporal course of the regression in these cases corresponds to that of the puff I-18-C. After injection of 45 CU ecdysone the puff IV-2-B remains unchanged for 48 hrs., then regresses in contrast to puff I-18-C. Puff IV-2-B has never been found to react to ecdysone without a simultaneous reaction of gene I-18-C. In the case of animals in which both puffs are regressing the size of the 2 puffs is correlated.

4. Between 5 and 20 hrs. after the injection a large number of genes the puffing of which is not specific for development, become more active and form large puffs. These puff enlargements were obtained with all ecdysone doses used, especially with 45 CU. The maintenance of the enhanced activity is specific for the different single puffs of this group; it may be maintained longer than ecdysone is present in the hemolymph. Occasionally the activation of certain genes in this group may be missing in an individual, even though all other gene reactions occur. The failure of certain gene reactions in this group has no influence on the progress of development.

5. 48 and 72 hrs. after the injection 2 genes become active (I-1-A and II-14-A) which form puffs specific for the prepupa. These puff formations occurred only in animals in which reactions of genes I-18-C and IV-2-B have taken place.

6. Not all puff forming genes react in the moulting process. Balbiani rings show no reaction.

7. According to their role in metamorphosis the puffing reactions studied in this paper can be divided into three groups: (1) the early reactions of genes I-18-C and IV-2-B, (2) the puffing reactions that are not specific for development, (3) the late reactions of puffs which are specific for metamorphosis. Of these only group 1 can be involved in the process of pupation induction itself. The two genes, I-18-C and IV-2-B, retain their induced activity only as long as ecdysone is present in the hemolymph. Contrary to puff I-18-C, puff IV-2-B can regress although ecdysone is still present in the hemolymph. All experiments indicate that puff I-18-C is nearer to the primary action of the hormone than puff IV-2-B. The hypothesis is discussed that the primary effect



of ecdysone is to activate a small number of specific genes, probably only one gene. In *C. tentans*, this gene may be represented by puff I-18-C.

### Literatur

- AUGENFELD, J.M., and J.C. NEES: Observations on the respiratory enzymes of various life-stages of *Chironomus*. Biol. Bull. **120**, 129—139 (1961).
- BECKER, H. J.: Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, *Giant* und *Lethal-giant-larvae*. Chromosoma (Berl.) **10**, 654—678 (1959).
- BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma (Berl.) **5**, 139—198 (1952); — Cytologische Analyse eines *Camptochironomus*-Artbastards. I. Kreuzungsergebnisse und die Evolution des Karyotypus. Chromosoma (Berl.) **7**, 198—259 (1955); — Chromosomal differentiation in insects, in *Developmental Cytology*, ed by D. RUDNICK. New York: Ronald 1959; — Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsen-Mutation. Chromosoma (Berl.) **12**, 1—25 (1961).
- BREUER, M.E., and C. PAVAN: Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.) **7**, 371—386 (1955).
- BUTENANDT, A., u. P. KARLSON: Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form. Z. Naturforsch. **9b**, 389—391 (1954).
- CLEVELAND, L.R.: Sex induced with ecdysone. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 747—753 (1959).
- , and A.W. BURKE: Modifications induced in the sexual cycles of the protozoa of *Cryptocercus* by change of the host. J. Protozool. **7**, 240—245 (1960).
- — and P. KARLSON: Ecdysone induced modifications in the sexual cycles of the protozoa of *Cryptocercus*. J. Protozool. **7**, 229—239 (1960).
- CLEVER, U.: Untersuchungen zur Zelldifferenzierung und Musterbildung der Sinnesorgane und des Nervensystems im Wachsmottenflügel. Z. Morph. Ökol. Tiere **47**, 201—248 (1958); — Über das Reaktionssystem einer hormonalen Induktion. Untersuchungen an *Chironomus tentans*. Verh. dtsh. zool. Ges. 1961 a (im Druck); — Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Chironomus tentans* und ihre Beziehungen zur Entwicklung. II. Das Puffmuster der Speicheldrüsenchromosomen in der Normalentwicklung. In Vorbereitung 1961 b.
- , u. P. KARLSON: Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. Exp. Cell Res. **20**, 623—626 (1960).
- GORINI, L., and W.K. MAAS: Feed-back control of the formation of biosynthetic enzymes. In: The chemical basis of development, ed by W.D. McELROY and B. GLASS. Baltimore: John Hopkins Press 1958.
- HECHTER, O., and G. LESTER: Cell permeability and hormone action. Recent. Progr. Hormone Res. **16**, 139—179 (1960).
- HENKE, K.: Über Zelldifferenzierungen im Integument der Insekten und ihre Bedingungen. J. Embryol. exp. Morph. **1**, 217—226 (1953).
- KARLSON, P.: Chemische Untersuchungen über die Metamorphosehormone der Insekten. Ann. Sci. nat. Zool. **11**, 125—137 (1956); — Zur Chemie und Wirkungsweise der Insektenhormone. In: Fourth Int. Congr. of Biochemistry, Vol. XII, Biochemistry of Insects, London 1959.
- , u. P. SCHMIALEK: Nachweis der Exkretion von Juvenilhormon. Z. Naturforsch. **14b**, 821 (1959).

- KETCHELL, M.M., and C.M. WILLIAMS: The prothoracic gland hormone as a sustained stimulus for the growth and differentiation of insect tissues. *Anat. Rec.* **117**, 542 (1953).
- KURLAND, C.G., and H.A. SCHNEIDERMAN: The respiratory enzymes of diapausing silkworm pupae: a new interpretation of carbon monoxide-insensitive respiration. *Biol. Bull.* **116**, 136—161 (1959).
- KÜHN, A., u. H. PIEPHO: Die Reaktion der Hypodermis und der Versonschen Drüsen auf das Verpuppungshormon bei *Ephesia kühniella* Z. *Biol. Zbl.* **58**, 12—51 (1938).
- LUDWIG, D.: Cytochrome oxidase activity during diapause and metamorphosis of the japanese beetle (*Popillia japonica*). *J. gen. Physiol.* **36**, 751—757 (1953).
- MACDONALD, S., and A.W.A. BROWN: Cytochrome oxidase and cyanide sensitivity of the larch sawfly during metamorphosis. *Ann. Rep. Ent. Soc. Ont.* **83**, 30—34 (1952). *Zit. nach* WIGGLESWORTH 1954.
- MECHELKE, F.: Reversible Strukturmodifikationen der Speicheldrüsenchromosomen von *Acricotopus lucidus*. *Chromosoma (Berl.)* **5**, 511—543 (1953); — The timetable of physiological activity of several loci in the salivary gland chromosomes of *Acricotopus lucidus*. *Proc. X. Int. Congr. of Genetics*, Vol. II, 185 (1958); — Beziehungen zwischen der Menge der DNS und dem Ausmaß der potentiellen Oberflächenentfaltung von Riesenchromosomenloci. *Naturwissenschaften* **48**, 609 (1959).
- PANITZ, R.: Innersekretorische Wirkungen auf Strukturmodifikationen der Speicheldrüsenchromosomen von *Acricotopus lucidus*. *Naturwissenschaften* **47**, 383 (1960).
- PELLING, C.: Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium. *Nature (Lond.)* **184**, 655—656 (1959).
- PIEPHO, H.: Über die Lenkung der Insektenmetamorphose durch Hormone. *Verh. dtsh. zool. Ges.* 1951, 62—76.
- RUDKIN, G.T., and Ph. S. WOODS: Incorporation of  $H^3$ -cytidine and  $H^3$ -thymidine into the giant chromosomes of *Drosophila* during puff formation. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 997—1003 (1959).
- SCHMIDT, E.L., and C.M. WILLIAMS: Physiology of insect diapause. V. Assay of growth and differentiation hormone of *Lepidoptera* by the method of tissue culture. *Biol. Bull.* **105**, 174—187 (1953).
- SCHNEIDERMAN, H.A., and C.M. WILLIAMS: The physiology of insect diapause. IX. The cytochrome oxidase system in relation to the diapause development of the *Cecropia* silkworm. *Biol. Bull.* **106**, 238—252 (1954).
- SIRLIN, J.L.: Cell sites of RNA and protein synthesis in the salivary gland of *Smittia*. *Exp. Cell. Res.* **19**, 177—180 (1960).
- SLÁMA, K.: Physiology of sawfly metamorphosis. I. Continuous respiration in diapausing prepupae and pupae. *J. Ins. Physiol.* **5**, 341—348 (1960).
- WIGGLESWORTH, V.B.: Determination of cell function in an insect. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 269—277 (1953); — The physiology of insect metamorphosis. Cambridge: Cambridge University Press 1954; — The action of growth hormones in insects. *Symp. Soc. exp. Biol.* **9**, 204—226 (1957); — Metamorphosis and body form. *The Harvey Lectures 1958—1959*. New York: Academic Press 1960.
- WILLIAMS, C.M.: Biochemical mechanisms in insect growth and metamorphosis. *Fed. Proc.* **10**, 546—552 (1951); — Physiology of insect diapause. IV. The brain and the prothoracic glands as an endocrine system in the *Cecropia* silkworm. *Biol. Bull.* **103**, 120—138 (1952).

Dr. ULRICH CLEVER

Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung BEERMANN  
Tübingen, Spemannstraße 34

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. BEERMANN, Tübingen

# PHASENSPEZIFISCHE FUNKTIONSSTRUKTUREN IN SPERMATOCYTENKERNEN VON DROSOPHILA MELANOGASTER UND IHRE ABHÄNGIGKEIT VOM Y-CHROMOSOM

Von

G. F. MEYER, O. HESS und W. BEERMANN

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. September 1961)

## Inhaltsübersicht

|  | Seite |
|--|-------|
| A. Einleitung . . . . .  | 676   |
| B. Material und Methode . . . . .  | 678   |
| 1. Genetische Grundlagen . . . . .   | 678   |
| 2. Cytologische und cytochemische Methoden . . . . .   | 679   |
| C. Ergebnisse . . . . .  | 680   |
| I. Allgemeine elektronenmikroskopische Kennzeichen der Spermatocytenkerne von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .         | 680   |
| 1. Chromosomen . . . . .   | 680   |
| 2. Der Nukleolus und Material nukleolärer Herkunft . . . . .   | 681   |
| II. Spezifische Funktionsstrukturen der Spermatocytenkerne von normalen X/Y-Männchen . . . . .                                 | 683   |
| 1. Die „Tubuli“ . . . . .  | 683   |
| 2. Das „retikuläre“ Material . . . . .   | 687   |
| 3. Andere Funktionsstrukturen . . . . .  | 689   |
| 4. Cytochemie . . . . .  | 690   |
| 5. Zusammenfassende Darstellung nach Lebendpräparaten . . . . .  | 693   |
| III. Spermatocytenkerne von X/O-Männchen und Männchen mit Y-Fragmenten . . . . .   | 696   |
| 1. Männchen ohne Y-Chromosom (X/O-Männchen) . . . . .  | 696   |
| a) Lichtmikroskopische Befunde . . . . .   | 696   |
| b) Elektronenmikroskopische Befunde . . . . .  | 698   |
| c) Die Kristallnadeln . . . . .  | 700   |
| 2. Männchen ohne den kurzen Arm des Y-Chromosoms (X/Y <sup>Le</sup> - und X·Y <sup>Le</sup> -Männchen) . . . . .               | 704   |
| 3. Männchen ohne den langen Arm des Y-Chromosoms (X·Y <sup>S</sup> - und X/Y <sup>S</sup> ·Y <sup>S</sup> -Männchen) . . . . . | 706   |
| D. Diskussion . . . . .  | 707   |
| Summary . . . . .  | 713   |
| Literatur . . . . .  | 714   |

## A. Einleitung

Im Gegensatz zum Cytoplasma erscheint der interphasische Zellkern im Elektronenmikroskop auffallend arm an Strukturen. Das chromosomale Material verteilt sich in Form feinsten Nukleoproteidfibrillen über den ganzen Kernraum (Literatur bei MOSES 1960). Die lichtoptisch als

„Chromozentren“, „Chromatinbrocken“ usw. definierten Strukturen erweisen sich dabei als Ballungszonen von chromosomalen Fibrillen. Weder die einzelne Fibrille noch das Fibrillengefüge als ganzes lassen eine Andeutung jener submikroskopischen Ordnungsprinzipien erkennen, die nach unseren Kenntnissen des meiotischen Chromosomenformwechsels die Morphologie der Chromosomen zweifellos beherrschen. Das gilt auch für mitotische Chromosomen. Abgesehen von der Kinetochorregion (BERNHARD und DE HARVEN 1960, RUTHMANN 1959) ist elektronenmikroskopisch eine Unterscheidung der lichtoptisch (mehr oder minder willkürlich) als Chromonemata, Chromomeren, Matrix oder Pellicula definierten Strukturelemente unmöglich. Die Ausnahmen beschränken sich auf interessante Einzelbefunde an Protozoen (PAPPAS und BRAND 1960, GRELL und WOHLFARTH-BOTTERMANN 1957), den Aufbau der Spermienköpfe bei verschiedenen Tieren (z. B. RIS 1958) und schließlich auf eine bestimmte Phase des meiotischen Chromosomenformwechsels, die Paarungsstadien des Pachytäns (MOSES 1960). Im übrigen wird das elektronenmikroskopische Bild des Zellkerns durch die Kernmembran und den Nukleolus bestimmt.

Mit den Untersuchungen an den polytären Chromosomen der Dipteren (BEERMANN und BAHR 1954) und an den Lampenbürsten-Chromosomen der Oocyten von Amphibien und anderen Organismen (z. B. GALL 1956) ist inzwischen ein weiterer Aspekt der Chromosomen-Morphologie in den Vordergrund getreten. Im interphasischen Zellkern kann die Chromosomen-Feinstruktur im Zusammenhang mit genphysiologischen Aktivitätsperioden lokal oder auch über größere Bereiche hinweg modifiziert erscheinen. Dabei treten im licht- und besonders elektronenmikroskopischen Bilde der Chromosomen neuartige, spezifische Strukturelemente in Erscheinung, etwa in Form von Granula oder auch als fibrilläres Material. Als besonders reich an solchen Strukturen haben sich die Lampenbürsten-Chromosomen erwiesen, die für die Wachstumsphasen der weiblichen Gametogenese charakteristisch sind. Die Möglichkeit, daß auch die männliche Gametogenese in den Wachstumsphasen durch eine ähnliche intranukleäre Aktivität gekennzeichnet sein kann, ist demgegenüber bisher nicht beachtet worden. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den Spermatocyten von *Drosophila melanogaster*, die ursprünglich ein anderes Ziel hatten, sind aber in den Kernen gerade dieser Zellen, im Gegensatz zu Oocyten- oder Nährzellkernen der gleichen Spezies, ungewöhnlich viele chromosomale Strukturen zum Vorschein gekommen, die sicher funktionellen Charakter besitzen. Eine vorläufige Mitteilung über die morphologischen Befunde ist bereits erschienen (MEYER 1961). In der folgenden Arbeit sollen diese Befunde ausführlich dargestellt und durch Untersuchungen über den gen-physiologischen Hintergrund der morphologischen Phänomene ergänzt werden.

## B. Material und Methode

### 1. Genetische Grundlagen

Es wurden Männchen von *Drosophila melanogaster* aus dem Wildstamm „Sevelen“ (Zürich) untersucht. X/O-Männchen wurden durch Auskreuzen normaler Männchen mit „X-Attached“-Weibchen der Konstitution  $y^2 su-w^a w^a bb/O$  hergestellt. Vor diesen Kreuzungen war sichergestellt worden, daß die Weibchen des „X-Attached“-Stammes keine Y-Chromosomen enthielten. Außerdem wurden in allen X/O-Kreuzungen in der F<sub>1</sub>-Generation in Stichproben Männchen auf Sterilität und Weibchen auf Jungfräulichkeit geprüft.

X/Y<sup>Lc</sup>-Männchen wurden erhalten, indem Männchen der Konstitution X.Y<sup>S</sup>/Y<sup>Lc</sup> mit Weibchen unseres Wildstammes gekreuzt wurden. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Söhne besitzen alle anstelle eines normalen Y-Chromosoms das Y<sup>Lc</sup>.

Y<sup>Lc</sup> ist ein zu einem Ring geschlossenes Fragment des Y-Chromosoms. Seine Entstehung wurde von MÜLLER (1948, 1949) beschrieben. Y<sup>Lc</sup> besitzt alle Fertilitätsfaktoren des langen Armes, dagegen fehlen ihm entweder beide oder zumindest einer der beiden bisher auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms gefundenen Fertilitätsfaktoren. Das Fragment verhält sich außerdem so, als fehle ihm der Locus des Gens „bobbed“, oder aber als besäße es nur ein sehr extremes Allel dieses Gens (entsprechend etwa dem Allel bb<sup>1</sup>). „bb“ ist das einzige bisher bekannt gewordene Gen, das im Y-Chromosom ein Allel zu einem Locus auf dem X-Chromosom hat. Nach COOPER (1959) liegt sein Locus auf dem Y-Chromosom sehr wahrscheinlich im proximalen Abschnitt des kurzen Armes. Es ist also zu vermuten, daß dem Fragment Y<sup>Lc</sup> der kurze Arm des Y-Chromosoms fehlt. Die mitotische Länge von Y<sup>Lc</sup> entspricht ungefähr der eines X-Chromosoms. Männchen, die außer dem Y<sup>Lc</sup> noch einen kurzen Arm des Y-Chromosoms besitzen, sind voll fertil. Kreuzt man die X.Y<sup>S</sup>/Y<sup>Lc</sup>-Männchen mit „X-Attached“-Weibchen ( $y^2 su-w^a w^a bb/O$ ), dann erhält man ausschließlich Söhne der Konstitution X.Y<sup>S</sup>/O.

In einer weiteren Kreuzung wurden  $y^2 su-w^a w^a bb$ -Weibchen mit y w.Y<sup>L</sup>/Y<sup>S</sup>.Y<sup>S</sup>-Männchen gekreuzt. Die daraus hervorgehenden y w.Y<sup>L</sup>/O-Söhne wurden ebenfalls cytologisch untersucht und mit X/Y<sup>Lc</sup>-Männchen verglichen. In der F<sub>1</sub>-Generation dieser Kreuzung besitzen die Weibchen die genetische Konstitution  $y^2 su-w^a w^a bb/Y^S.Y^S$ . Sie wurden mit Männchen des Wildstammes gekreuzt. Die aus dieser zweiten Kreuzung hervorgehenden Männchen haben die Konstitution X/Y<sup>S</sup>.Y<sup>S</sup>.

Die Entstehung der zusammengesetzten Translokations-Chromosomen X.Y<sup>L</sup> und X.Y<sup>S</sup> durch „Detachment“ von „X-Attached“-Chromosomen infolge Crossing-over mit einem normalen Y-Chromosom wurde von KAUFMANN (1933) beschrieben. Das Chromosom Y<sup>S</sup>.Y<sup>S</sup> wurde von STERN (1929) gefunden und damals mit Y'' bezeichnet. Es ist V-förmig, jeder seiner beiden Arme hat ungefähr die Länge eines kurzen Armes des Y-Chromosoms. STERN glaubte, daß es sich um ein Fragment aus dem vollständigen kurzen und aus einem proximalen Abschnitt des langen Y-Armes handele. NEUHAUS (1936) hielt es dagegen für wahrscheinlicher, daß das Y'' aus zwei gleichen kurzen Y-Armen besteht. Dieser Widerspruch ist auch heute noch nicht geklärt. Für unsere Problemstellung ist diese Frage

aber nicht entscheidend. Mit Sicherheit kann jedoch gesagt werden, daß dem  $Y'$  mindestens ein Teil des Fertilitätsfaktoren-Komplexes des langen Y-Armes fehlt, während der Komplex des kurzen Armes vollständig vorhanden ist, denn  $X/Y''/Y^L-\delta\delta$  sind fertil.

Bei den bis jetzt beschriebenen Männchen sollte untersucht werden, ob das Y-Chromosom oder bestimmte Abschnitte davon einen Einfluß auf die Bildung bestimmter Funktionsstrukturen im Zellkern während der Meiose haben. In einer weiteren Reihe von Experimenten sollte anschließend noch geklärt werden, ob vielleicht auch Mutationen von Genen des X-Chromosoms einen Einfluß ausüben können. Hierzu wurden noch  $FM4$ ,  $y^{31d} sc^8 dm B/O$ -Männchen untersucht, die aus  $FM4/Y$ -Männchen in gleicher Weise hergestellt wurden wie die  $X/O$ -Männchen aus dem Wildstamm.

In unseren Versuchen stellte sich heraus, daß im Gegensatz zu den  $FM4/Y$ -Männchen die  $FM4/O$ -Männchen in ihrer Vitalität stark herabgesetzt sind. Nach dem Kreuzungsschema sind in der  $F_1$ -Generation gleichviel  $FM4/O$ -Männchen wie Weibchen zu erwarten. Tatsächlich gingen aber aus fünf ausgezählten Kreuzungen neben 1890 Weibchen nur 205 Männchen hervor. Es soll noch ergänzend erwähnt werden, daß homozygote  $FM4/FM4$ -Weibchen voll vital sind. Eine Erklärung dieser Befunde ist vielleicht auf Grund der nachfolgenden Überlegungen möglich. Das  $FM4$ -Chromosom enthält die *scute*-8-Inversion. Der erste Bruch dieser Inversion liegt im Euchromatin zwischen den Loci von „*achaete*“ (*ac*) und „*scute*“ (*sc*), der zweite liegt im Bereich des kinetochor-nahen Heterochromatins. Danach ist ein Positionseffekt vom Variegated-Typ zu erwarten. Für einen Positionseffekt dieser Art ist charakteristisch, daß sein Ausprägungsgrad stark variiert. Als Modifikator ist die Menge des im Genom vorhandenen Heterochromatins besonders wirksam, und zwar wird ein solcher Positionseffekt durch ein überzähliges Y-Chromosom häufig völlig unterdrückt, beim Fehlen eines Y-Chromosoms (in  $X/O$ -Männchen) dagegen besonders extrem ausgeprägt (Literatur bei LEWIS 1950). Im Falle der  $FM4$ -Männchen könnte man demnach an einen letalen Positionseffekt infolge der *sc*<sup>8</sup>-Inversion denken, der wie ein Variegated-Effekt variiert, bei normaler Heterochromatinmenge im Genom, d. h. in  $FM4/Y$ -Männchen und homozygoten  $FM4/FM4$ -Weibchen aber nicht in Erscheinung tritt, dagegen bei einer geringeren als normalen Heterochromatinmenge, wie z. B. in den  $FM4/O$ -Männchen, erkennbar wird. Gleiches Verhalten wurde von uns inzwischen bei mehreren daraufhin untersuchten *sc*-Mutationen gefunden. Diese Befunde sollen in einer weiteren Arbeit noch ausführlich bekannt gegeben werden.

## 2. Cytologische und cytochemische Methoden

Hoden von *Drosophila melanogaster* wurden in Insekten-Ringer-Lösung nach PRINGLE herauspräpariert, in 1%iger, gepufferter  $OsO_4$ -Lösung nach SÖSTRAND fixiert und nach Auswaschen in Tyrode-Lösung über die Methanolreihe in Methacrylat eingebettet. Dünnschnitte für die elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchung wurden mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom und einem LKB-„Ultratome“ angefertigt. Zur Nachkontrastierung fanden eine 0,1%ige Uranylacetatlösung (30 min) oder eine gesättigte Lösung von Bleiacetat (5 min) Verwendung. Alle Schnitte wurden vor dem Einbringen in das Elektronenmikroskop dünn mit Kohle bedampft. Vor der Färbung für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden die Methacrylatschnitte in Wasserstoffperoxyd (3%, 1 Std)

gebleicht. Gefärbt wurde mit Toluidinblau, Azur B und nach FEULGEN. Außerdem wurden ungefärbte 0,2–2  $\mu$  dicke Schnitte in das „Einschlusmittel Zeiss W 15“ eingedeckt und ohne vorherige Bleichung im Phasenkontrastmikroskop betrachtet (Technik bei RUTHMANN 1961). Besonders klare Bilder erhält man, wenn man lebendes Gewebe unmittelbar nach der Präparation in Ringer-Lösung untersucht.

Die Fermentreaktionen am Dünnschnitt erfolgten an formalinfixiertem Material (Formalin nach HERZBERG 1953). Auch hier wurde vor der Einbettung in Methacrylat mit Methanol entwässert. Die Strukturhaltung ist fast so gut wie nach  $\text{OsO}_4$ -Fixierung. Als Fermente wurden verwendet: Pepsin (0,5% in  $1/10$  n-HCl), Trypsin (0,3% in 0,01 mol. Natriumbicarbonat, pH 8,0) und Ribonuklease (0,1% in Aqua dest.). Alle Reaktionen erfolgten bei  $+37^\circ$  im Thermostaten. Die Einwirkungszeit betrug bei Pepsin 30 min bis 2 Std, bei Trypsin 2 Std und bei RNase 30 min bis 2 Std. Als Kontrolle diente das jeweilige Lösungsmittel bei entsprechender Temperatur. Nach Auswaschen mit Aqua dest. wurden die Schnitte wiederum mit Uranylacetat kontrastiert und dünn mit Kohle bedampft. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Siemens Elmiskop I und einem Hitachi HS 6 angefertigt<sup>1</sup>.

### C. Ergebnisse

#### *1. Allgemeine elektronenmikroskopische Kennzeichen der Spermatocytenkerne von Drosophila melanogaster*

Während die Spermatogonienkerne (Abb. 1) das übliche elektronenmikroskopische Bild eines Interphasekernes mit chromozentrenähnlichen Verdichtungen fibrillären Materials bieten und eine einfache Kernmembran besitzen, sind die Spermatocytenkerne durch das Auftreten einer zweifachen Kernmembran (MEYER 1961) sowie durch die Bildung eines spezifisch gebauten Nukleolus ausgezeichnet. Außerdem finden sich in Spermatocytenkernen Funktionsstrukturen, die in Spermatogonienkernen noch nicht vorhanden sind.

#### 1. Chromosomen

Da bei *Drosophila melanogaster*-♂♂ der Fall einer achiasmatischen Meiose mit vereinfachter Prophase vorliegt, ist der meiotische Chromosomenformwechsel bei diesem Objekt bis zur späten Diakinese auch heute noch umstritten (vgl. COOPER 1950). Elektronenmikroskopisch sind die Verhältnisse bis zur späten Diakinese erst recht unübersichtlich. Die Chromosomen erscheinen als Anhäufungen fibrillären Materials, das ohne erkennbare Organisation über große Teile des Kernes verteilt ist (Abb. 2ff). Das fibrilläre Material ist in jungen Spermatocyten stark aufgelockert, in älteren dagegen mehr kondensiert. Der Durchmesser der Fibrillen schwankt zwischen 50 und 100 AE. Die chromosomalen Fibrillen sind nicht erkennbar geordnet. Erst in älteren Spermatocyten und selbstverständlich in der Diakinese und Metaphase I wird die Ab-

<sup>1</sup> Für die Bereitstellung eines Teiles des Untersuchungsmaterials sind wir Fräulein S. SEIDEL und für sorgfältige technische Assistenz Fräulein G. THIES zu Dank verpflichtet.



grenzung des chromosomalen Fibrillenmaterials gegen interchromosomale Bestandteile deutlich (Abb. 4). Im allgemeinen ist jedoch das chromosomale Material so locker organisiert, daß Chromosomenindividuen nicht erkennbar sind (vgl. „Ch“ in Abb. 2).

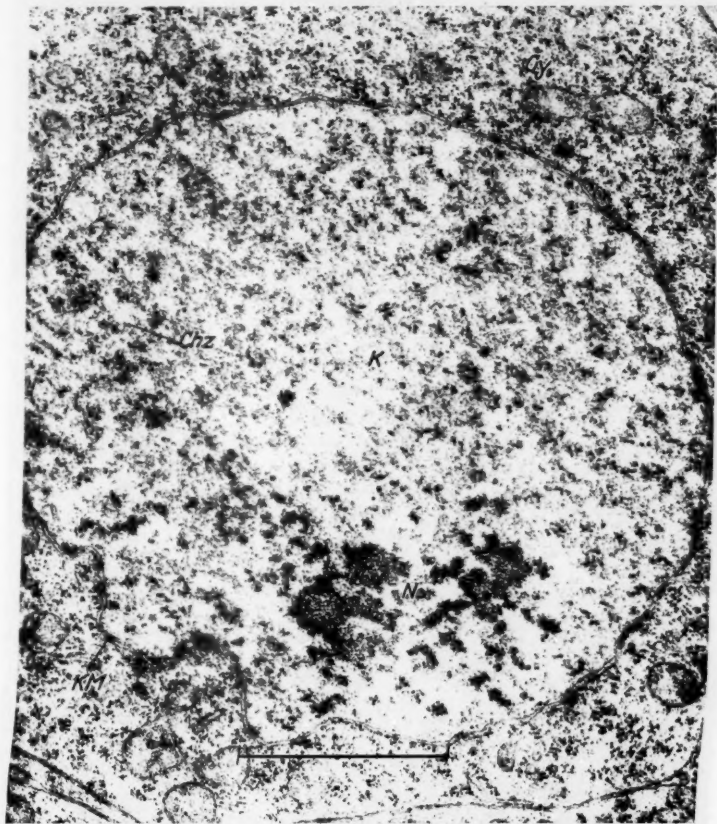


Abb. 1. Kern einer Spermatogonie, 30 000  $\times$ . Elektronenmikroskopisches Bild eines Interphasekernes. K Kern, N Nukleolus, Chz chromozentrenähnliche Verdichtungen, Cy Cytoplasma, KM normale (einfache) Kernmembran

## 2. Der Nukleolus und Material nukleolärer Herkunft

In den Spermatogonienkernen erscheint der Nukleolus nicht als einheitlicher Körper. Das stark osmiophile, aus zahlreichen submikroskopischen Granula aufgebaute nukleoläre Material bildet zwar im Zentrum

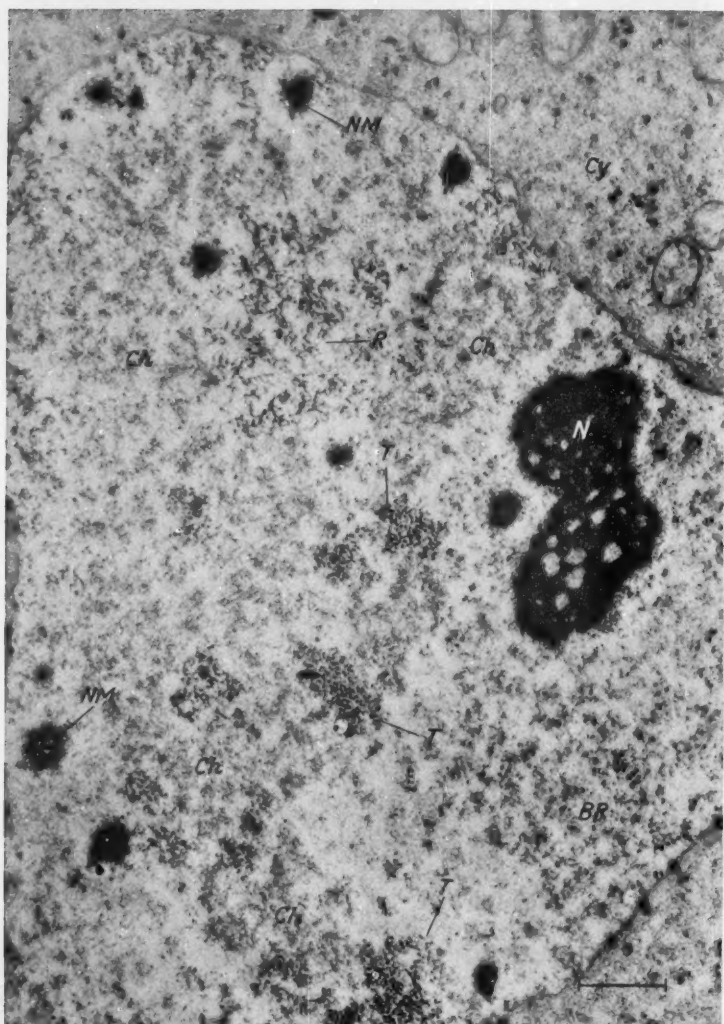


Abb. 2. Kern einer Spermatocyte I, 13300  $\times$ . *N* Nukleolus, *T* Tubuli, *R* retikuläres Material, *NM* Kugeln nukleolären Materials, *Ch* chromosomale Fibrillen, *BR* Balbiani-Ring-ähnliche Struktur, *Cy* Cytoplasma

des Nukleolenbereiches eine größere zusammenhängende Masse, gliedert sich aber in der peripheren Zone in Form größerer oder kleinerer Brocken ab, so daß elektronenoptisch das Bild eines lockeren Aggregates entsteht (vgl. Abb. 1). Beim Übergang in die Spermatocyte ändert sich das Aussehen des Nukleolus. Er weist in der meiotischen Prophase zunächst eine einheitliche spongiöse Struktur auf (Abb. 2). Auch hier besteht das Nukleolenmaterial aus stark osmiophilen Granula von 50 bis 100 AE Durchmesser. An der Peripherie des Nukleolus scheint sich etwas gröberes nukleoläres Material (Aufbau aus größeren Granula) abzusondern. Das gleiche gilt für die in ersten Spermatocyten regelmäßig durch den ganzen Kernraum verteilten Brocken nukleolären Materials (Durchmesser  $0,3\ \mu$ , vgl. auch Abb. 2). Die Zahl dieser Bröckchen nimmt im Verlaufe des Spermatocytenwachstums zu. Sie entstehen wahrscheinlich durch Abgliederung vom Hauptnukleolus (vgl. HUETTNER 1930). Etwa mit Einsetzen der Diakinese beginnt der Nukleolus zu zerfallen. In der Metaphase I sind Reste des Nukleolus nicht mehr nachzuweisen.

## II. Spezifische Funktionsstrukturen der Spermatocytenkerne von normalen X/Y-Männchen

### 1. Die „Tubuli“

In der Umgebung der chromosomalen Fibrillen entstehen mit Einsetzen der meiotischen Prophase, d.h. beim Übergang von der Spermatogonie zur Spermatocyte I, neue Strukturelemente, deren starke Osmiophilie mit der des Nukleolus vergleichbar ist (Abb. 2). Schon bei schwacher elektronenoptischer Vergrößerung ist zu erkennen, daß es sich zum größten Teil um ein einheitliches Material handelt, das aus tubulären Elementen besteht. Der Durchmesser dieser „Tubuli“ schwankt in älteren Wachstumsstadien zwischen 300–400 AE, beträgt dagegen in jungen Spermatocyten nur wenig mehr als 200 AE. Bei hoher Auflösung erkennt man gerade eben noch eine Gliederung, durch welche die Tubuli in ziemlich regelmäßige Abschnitte aufgeteilt werden. Die Septen sind etwa 40 AE dick und liegen in Abständen von 80 bis 100 AE. Der Durchmesser der Außenwand eines solchen Röhrchens beträgt im Mittel 80 AE. Besonders bei median liegenden Längsschnitten ist die Kammerung deutlich zu erkennen. Da die Tubuli meistens stark geknäult sind, kann für ihre Länge nur ein Mindestwert angegeben werden. In den Schnitten werden in günstigen Fällen tubuläre Elemente bis zu  $0,3\ \mu$  Länge erfaßt. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß die Tubuli in Wirklichkeit eine Länge von mehreren Mikron erreichen.

Die Genese der Tubuli im frühen Spermatocyten-Kern ist noch nicht aufgeklärt. Die Anfangsstadien sind selten, woraus jedenfalls folgt, daß

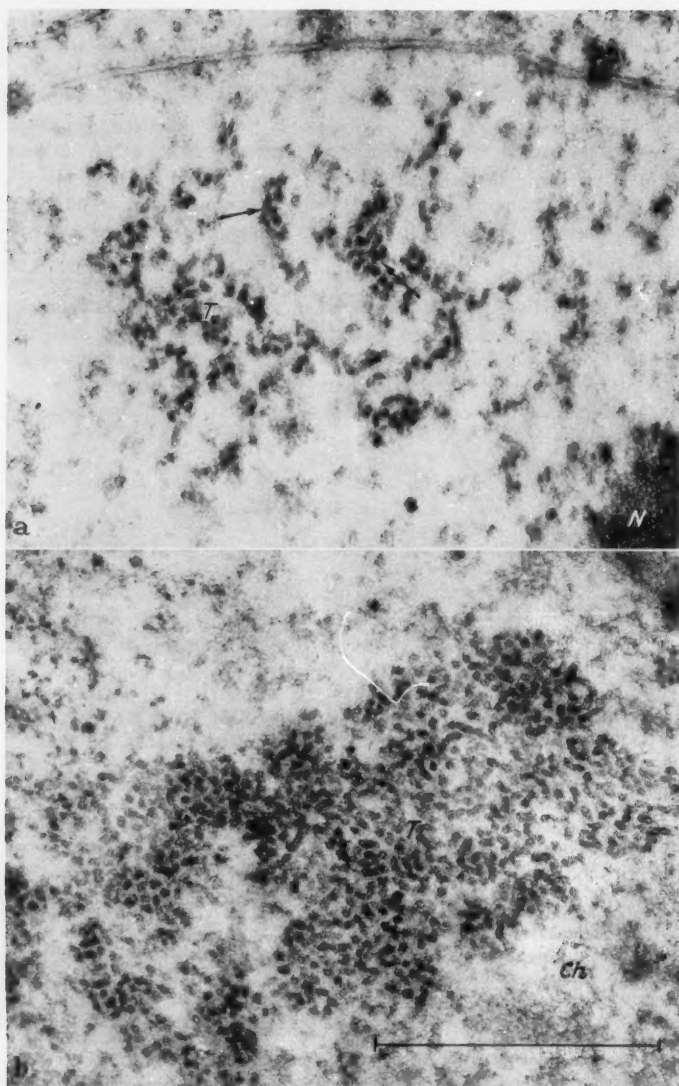


Abb. 3 a u. b (Legende S. 685)

die Bildung der Tubuli rasch abgeschlossen ist. Möglicherweise gehen die Tubuli durch Aggregation aus schon vorher gebildeten Untereinheiten hervor, denn man findet in den jüngsten Spermatocyten, deren Kerne noch keine durchgehend zweifache Membran besitzen, zahlreiche „hohle“ Granula von etwa 200 AE Durchmesser (Abb. 6), und zwar stets im Zusammenhang mit den Chromosomen. Die Schnittbilder sehr junger Spermatocyten-Kerne legen ferner die Möglichkeit nahe, daß die Entstehung von Tubuli an mehreren Stellen gleichzeitig beginnt. Dieser Deutung widersprechen jedoch die lichtoptischen Bilder von ganzen Spermatocyten-Kernen (s. u.), die das tubuläre Material stets als zusammenhängendes Netz darstellen. Die Frage könnte durch elektronenoptische Schnittserien geklärt werden.

Da Tubuli bei jungen Spermatocyten regelmäßig auch in unmittelbarer Umgebung des Nukleolus gebildet werden (Abb. 3a), erscheint eine Beteiligung des Heterochromatins der Geschlechtschromosomen an ihrer Bildung nicht ausgeschlossen (vgl. Diskussion). In allen Fällen bestehen aber auch enge topographische Beziehungen zu den chromosomalen Fibrillen, in denen man wohl die euchromatischen Anteile der Autosomen-Bivalente und des X-Chromosoms zu sehen hat. Von diesen isoliert im Kern liegende Tubuli wurden niemals beobachtet.

Die Tubuli sind anfänglich noch ziemlich locker in kleinen Gruppen vereinigt. Mit der raschen Zunahme des tubulären Materials wird aber sehr bald auch die Lagerung der Einzelelemente dichter (Abb. 3b). Diese Tendenz zu enger Lagerung und Knäuelung wird beibehalten, auch nachdem die Bildung des tubulären Materials abgeschlossen ist. Im elektronenoptischen Schnittbild älterer Spermatocyten-Kerne bemerkt man ferner eine charakteristische Schichtung des tubulären Materials, dergestalt daß Schichten von Tubuli mit Schichten von chromosomalen Fibrillen abwechseln (Abb. 2). Dies läßt sich als schraubige Windung des tubulären Materials verstehen. Dabei ist der Kontakt zwischen den Tubuli und den chromosomalen Fibrillen offensichtlich sehr eng. Ob jedoch die chromosomalen Fibrillen auch in den Raum zwischen den Tubuli eindringen, ließ sich bislang nicht entscheiden (vgl. Abb. 3b).

Vor ihrer Auflösung in der Diakinese (vgl. Abschnitt 5) verklumpen die Tubuli. Zunächst bleibt dabei die tubuläre Struktur noch erhalten, später entstehen zwischen den verklumpten Tubuli homogene Kugeln von hoher Dichte. Gegen Ende des Prozesses sind fast nur noch diese

Abb. 3a u. b. Tubuli in Kernen von jungen (a) und alten (b) ersten Spermatocyten, 45 600  $\times$ . In (a) sind die Tubuli noch sehr locker organisiert (T), Andeutungen einer Kammerung sind erkennbar (Pfeile), N Nukleolus. In älteren Spermatocyten sind sie viel enger geknäuel (b), T Tubuli, CA chromosomale Fibrillen

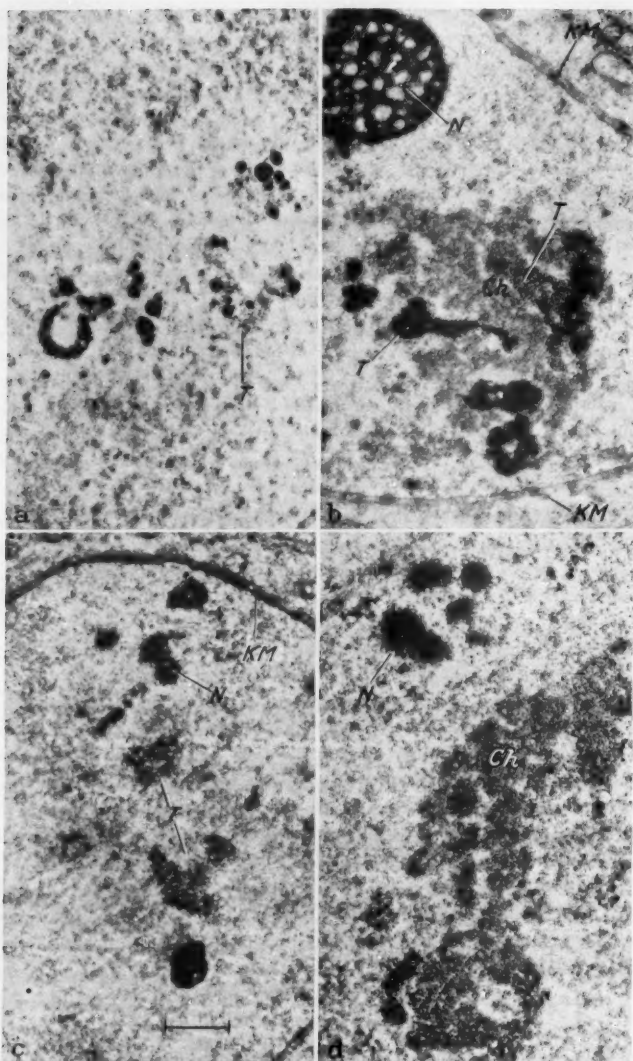


Abb. 4a—d. Verschiedene Verklumpungs- und Auflösungsstadien der Tubuli vor der Diakinese, die chronologische Reihenfolge der vier Stadien ist nicht gesichert, 10000  $\times$ .  
*T* Tubuli, *Ch* chromosomale Fibrillen, *N* Nukleolus, *KM* zweifache Kernmembran



Kugeln im Kern erkennbar (vgl. Abb. 4). Sie zerfallen und ihre Bruchstücke lösen sich vermutlich auf. Die auch im Lichtmikroskop (Abb. 9) erkennbaren stark lichtbrechenden und basophilen Körperchen im Umkreis der Spindelpole erweisen sich im Elektronenmikroskop (Abb. 5) als Lamellenkörperchen, wie sie auch im Cytoplasma jüngerer Spermatocyten während der Wachstumsphase vorkommen. Es kann sich demnach nicht um umgebildetes, tubuläres Material handeln. Alle Beobachtungen sprechen dafür, daß das tubuläre Material im Kern bis zu dessen Teilung verbleibt und nicht in Form unversehrter Tubuli ins Cytoplasma ausgeschleust wird. Von der Diakinese an sind elektronenmikroskopisch nur noch einige lockere Ansammlungen von Granula im Kernraum zu erkennen (Abb. 5); dieses Material liegt aber nicht in unmittelbarer Umgebung der Chromosomen. Über die Feinstruktur der Spindel hat bereits Iro (1960) berichtet.

## 2. Das „retikuläre“ Material

Ein weiterer, ebenfalls aus zylindrischen Elementen aufgebauter Bestandteil der wachsenden Spermatocyte I soll als retikuläre Komponente bezeichnet werden (Abb. 2). Schon bei schwacher Vergrößerung kann dieses Material ohne Schwierigkeiten von den oben beschriebenen eigentlichen Tubuli unterschieden werden. Es ist lockerer organisiert als die Tubuli. Seine einzelnen Elemente sind nicht geknäuel, aber unregelmäßig verzweigt und retikulär angeordnet (Abb. 2, 6). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein echtes Retikulum und nicht um optisch überlagerte unverzweigte Elemente (Abb. 6).

In jungen Spermatocyten, wenn beide Komponenten in Bildung begriffen sind, ist die Unterscheidung der „retikulären“ und der „tubulären“ Elemente manchmal erschwert (vgl. Abb. 6). In den frühen Stadien sind nämlich die Tubuli noch wenig geknäuel und erscheinen fast ebenso schlank wie die retikulären Elemente. In älteren Kernen dagegen nimmt der Durchmesser der retikulären Elemente im Vergleich zu dem der Tubuli nicht weiter zu und behält im Mittel den Wert von 200 AE bei (es kommen auch dünnere Stränge vor, bis herunter zu 100 AE). Da retikuläres Material gelegentlich dem tubulären dicht anliegt (Abb. 6), könnte man denken, daß die retikulären Elemente unter Umständen eine Vorstufe der Tubuli darstellen. Zwischenformen, die auch in älteren Spermatocyten noch auftreten müßten, weil ja in allen Stadien beide Komponenten nebeneinander vorkommen, wurden aber nicht beobachtet. Für die Unabhängigkeit beider Bildungen spricht ferner die Tatsache, daß sich beide Strukturen nie wechselseitig durchdringen, daß also keine Mischformen vorkommen und die topographischen Beziehungen zwischen dieser Komponente und den Chromosomen nicht



so eng und jedenfalls andere sind als im Falle der Tubuli. Das retikuläre Material ist weniger weitläufig über die Chromosomen und den

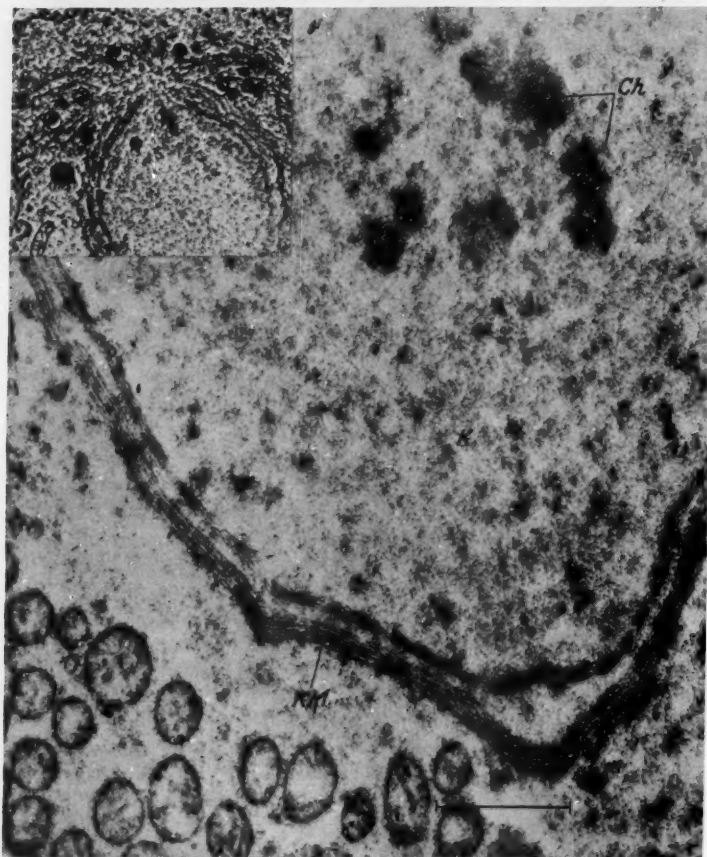


Abb. 5. Prometaphasier Kern mit Chromosomen, das tubuläre Material hat sich aufgelöst, 20 900  $\times$ . Ausschnittbild: Spindelpol mit Lamellenkörperchen, 6600  $\times$ .  
Ch Chromosomen, KM multiple Kernmembran, K Kernraum

Kernraum verteilt. Oft scheint es überhaupt nur eine einzige geschlossene Ansammlung zu bilden, z.B. in einer Bucht der Kernmembran (vgl. Abb. 7). Auch wurde nie eine regelmäßige Schichtung zwischen den chromosomalen Fibrillen beobachtet, wie sie die Tubuli oft zeigen

(Abb. 2 und 3b). Da in jungen Spermatocyten die Tubuli schon vor dem retikulären Material entstehen, ist allein deswegen eine Umbildung von retikulärem in tubuläres Material unwahrscheinlich.

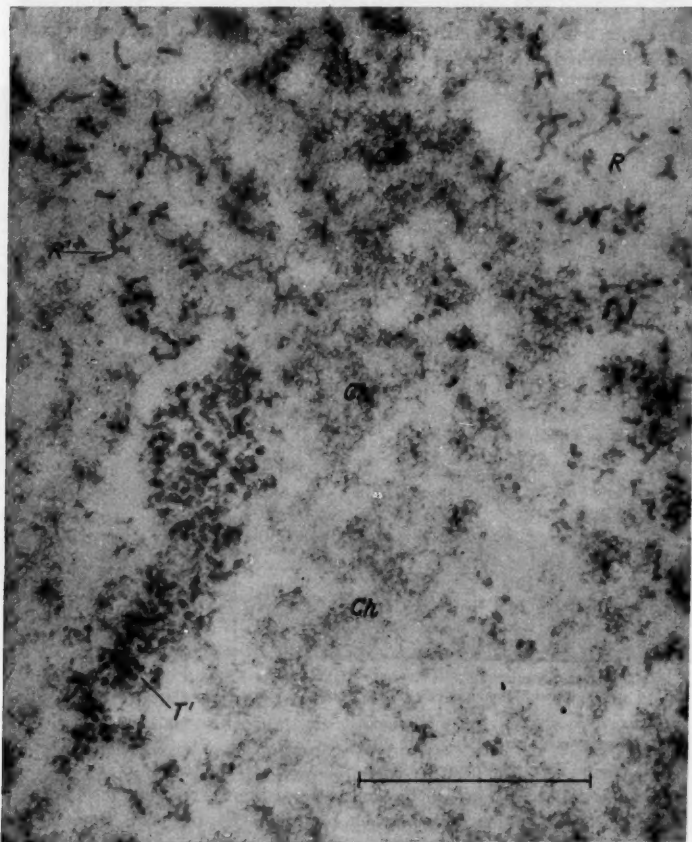


Abb. 6. Tubuläres und retikuläres Material, 37000  $\times$ . Tubuli und Retikula entstehen an den chromosomalen Fibrillen (Ch). T Tubuli, R retikuläres Material, bei R' sind Verzweigungen zu erkennen, bei T' erscheinen die Tubuli deutlich aus einer Reihe von Grana zusammengesetzt

### 3. Andere Funktionsstrukturen

Gleichzeitig mit den tubulären und retikulären Komponenten entstehen große, stark osmiophile Granula mit einem Durchmesser von

etwa 400—700 AE, die aber nur einzelne kleine Gruppen bilden, manchmal, besonders in älteren Kernen, in der Nähe der Kernmembran (Abb. 7), manchmal aber auch mitten im Kern. Diese Granula scheinen sich von ihren Bildungsorten in der Nähe chromosomaler Fibrillen auch abzulösen und dann in periphere Kernteile zu gelangen. Ihre Zahl nimmt im Verlaufe des Spermatocytenwachstumes wahrscheinlich nicht zu.

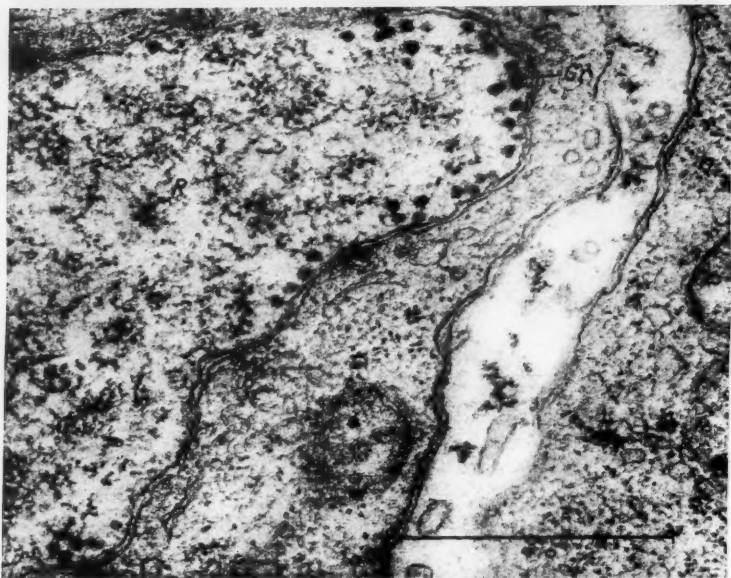


Abb. 7. Ausbuchtung des Kernes einer Spermatocyte I mit „großen Granula“ und retikulärem Material, 46 000  $\times$ . Gr Große Granula, R retikuläres Material

Chromosomenmaterial mit einer Feinstruktur, die derjenigen gleicht, wie sie von BEERMANN und BAHR (1954) für Balbiani-Ringe beschrieben wurde, tritt auch in ersten Spermatocyten von *Drosophila melanogaster* auf (Abb. 2). Dieses Material scheint einem bestimmten Bereich der chromosomalen Fibrillen geschlossen anzuliegen und besteht aus fibrillären und granulären Elementen. Diese Strukturen wurden noch nicht näher untersucht.

#### 4. Cytochemie

Da die Tubuli als einzige Kernkomponente außer den Chromosomen und dem Nukleolus auch im Lichtmikroskop sichtbar sind und quantitativ nach den Chromosomen am stärksten auffallen, konzentrierten

sich auf sie die angestellten cytochemischen Untersuchungen. Die Beantwortung der Frage nach der chemischen Natur der Tubuli ist für das Verständnis ihrer Bedeutung im Kernstoffwechsel entscheidend. Es wurden Reaktionen auf Proteine und Nukleinsäuren an normalen Mikrotomschnitten ( $2-3\ \mu$ ) und an Dünnschnitten (800—1000 AE) durchgeführt. Die Feulgen-Reaktion ergab an Paraffin- und Methacrylatschnitten eine nur sehr schwache, diffuse Anfärbung verschiedener Kernorte. Diese sind sicher mit den elektronenmikroskopisch sichtbaren fibrillären Kernkomponenten, also den Chromosomen, gleichzusetzen. In sehr jungen Spermatocyten kann auch die Randzone des Nukleolus noch schwach gefärbt erscheinen. Vermutlich handelt es sich hier um das Heterochromatin des Chromozentrums bzw. der Geschlechtschromosomen. Die Tubuli waren in keinem Falle Feulgen-positiv. Dieser Befund spricht aber nicht gegen einen möglichen Gehalt an DNS, da deren Konzentration in den Tubuli ähnlich gering oder noch geringer sein kann wie in den Chromosomen selbst. Ob die Tubuli DNS enthalten, muß also zunächst offen bleiben. Im übrigen Hoden erweisen sich nur die Kerne der Hüllzellen, die Chromozentren der Spermatogonien und natürlich die Spermienköpfe als deutlich Feulgen-positiv.

Etwas kräftiger fallen die Färbungen mit Toluidinblau und Azur B aus. Wenigstens in älteren Spermatocytenkernen konnten einige Strukturen als schwach basophil erkannt werden, die nach Lage und Struktur wohl mit dem tubulären Material identisch sind. Damit wird wahrscheinlich, daß Ribonukleinsäure am Aufbau der Tubuli beteiligt ist. Versuche, dieses Ergebnis durch Untersuchungen an Ultradünnschnitten mit Hilfe des Elektronenmikroskopes zu stützen, schlugen fehl. Dünnschnitte von formalinfixiertem Material wurden mit und ohne Vorbehandlung mit Ribonuklease in Uranylacetat kontrastiert. Es ergab sich jedoch kein Unterschied. RNase hat also auf die Struktur und den Kontrast der Tubuli keinen merklichen Einfluß (Abb. 8c). Dieses negative Ergebnis steht aber nicht unbedingt in Widerspruch zu der im Lichtmikroskop beobachteten schwachen Basophilie. Auch LEDUC und BERNHARD (1960) haben nach RNase-Behandlung des Ergastoplasmas die Ribosomen morphologisch unverändert gefunden. Entweder ist die RNS durch Proteine so gut gegen die Fermenteinwirkung geschützt, daß keine Reaktion stattfinden kann, oder das Proteingrundgerüst behält seine Struktur auch nach Herauslösung der RNS bei. Der Versuch, die Lokalisation der RNS direkt elektronenmikroskopisch an mit RNase vorbehandelten und an unbehandelten Schnitten durch eine modifizierte Toluidinblau-Molybdatreaktion nachzuweisen, führte ebenfalls zu keinem eindeutigen Ergebnis. In diesen Experimenten war nämlich oft gerade auch ohne RNase-Behandlung in den Tubuli keine Basophilie zu erkennen (kein Molybdatniederschlag). Nach diesen Experimenten

kann also zunächst auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die Tubuli überhaupt keine Nukleinsäure enthalten.

Zur Charakterisierung der Proteine wurden Fermentreaktionen mit Pepsin und Trypsin durchgeführt. Eine zweistündige Einwirkung von Pepsin-HCl auf Schnitte von formalinfixiertem Material ließ die Struktur im wesentlichen unverändert. Nach einer 30 min dauernden Einwir-

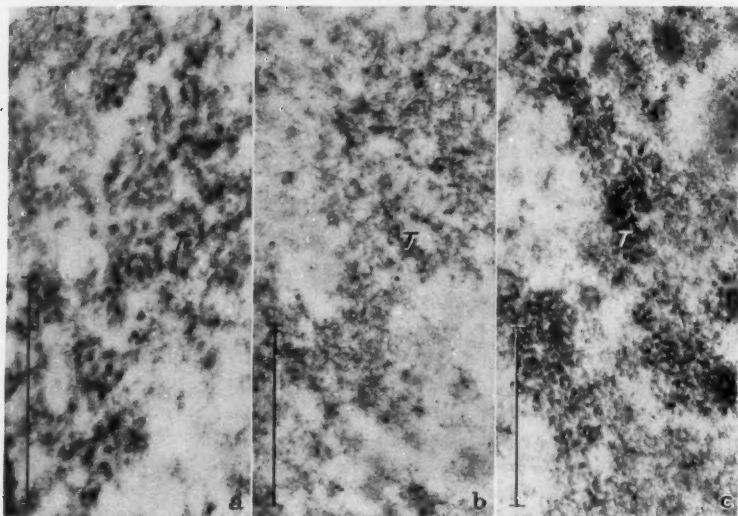


Abb. 8a—c. Fermentreaktionen an den Tubuli im Dünnschnitt. a Tubuli nach RNase-Behandlung, 36100  $\times$ . b Nach Trypsinbehandlung, 28500  $\times$ . c Nach Pepsinbehandlung, 28500  $\times$  (vgl. Text); T Tubuli

kung ist das elektronenmikroskopische Bild nicht grundsätzlich anders (Abb. 8a). Die tatsächlich beobachteten Veränderungen an der Feinstruktur treten auch bei gleich langer Behandlung mit einem pepsin-freien Kontrollmedium ( $1/10$  n-HCl), und bis zu einem gewissen Grade auch schon mit warmem, destilliertem Wasser allein auf.

Im Gegensatz zu Pepsin erhält man nach 2stündiger Behandlung mit Trypsin (0,3% bei 37° C) drastische Veränderungen des tubulären Materials (Abb. 8b). Hier lösen sich die Tubuli bis auf ein lockeres fibrilläres Gerüstwerk auf. Ob der nach Trypsinbehandlung verbleibende fibrilläre Restkörper vielleicht aus RNS besteht, ließ sich noch nicht entscheiden. Die Nachbehandlung von trypsinverdauten Schnitten mit RNase führt allgemein zu starken Schädigungen der Feinstruktur, die aber wohl größtenteils unspezifischer Natur sind. Der Unterschied der

Pepsin- und Trypsineffekte läßt über die am Aufbau der Tubuli beteiligten Proteine den folgenden Schluß zu: Das Protein der Tubuli ist reich an Lysin und Arginin; es handelt sich also um ein basisches Protein, vielleicht von Histoncharakter. Dies würde indirekt für eine Verknüpfung mit Nukleinsäuren sprechen, da basische Proteine im Zellkern in der Regel an Nukleinsäuren gebunden sind.

### 5. Zusammenfassende Darstellung nach Lebendpräparaten

Die elektronenmikroskopische Charakterisierung der verschiedenen Kernkomponenten läßt nunmehr eine exaktere Darstellung des Ablaufes der lichtmikroskopisch beobachtbaren Veränderungen in der meiotischen Prophase des Spermatocytenkernes möglich erscheinen. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 zusammengestellt. Das tubuläre Material erscheint in den Phasenkontrastbildern lebender Zellen (Abb. 9b—e) als dunkles, d. h. stärker lichtbrechendes Material, das den nur „hellgrauen“ (d. h. schwächer lichtbrechenden) Chromosomen, soweit diese überhaupt erkennbar sind, aufgelagert ist. In Spermatogonien (Abb. 9a) sind noch keine Tubuli vorhanden; die dichteren Stellen im Kern stellen nach den elektronenmikroskopischen Befunden und nach der Feulgen-Reaktion Teile der Chromozentren dar. Junge Spermatocyten I mit den ersten Tubuli sind in Abb. 9b zu sehen. Die Tubuli liegen anscheinend den Chromosomen an. Diese sind hier allerdings sehr locker organisiert; sie erscheinen in einem hellen Grau und lassen keine weiteren Einzelheiten erkennen. In Abb. 9b, oben, ist dunkles Material rechts vom Nukleolus zu sehen, das sich im Elektronenmikroskop mit Bestimmtheit als tubuläres Material erwiesen hat. Auch in anderen Fällen konnte dieser Nachweis durch die parallele Untersuchung aufeinanderfolgender Schnitte im Licht- und Elektronenmikroskop geführt werden. Das dunkle Material nimmt an Masse unter gleichzeitiger Vergrößerung des Kernvolumens rasch zu (Abb. 9c) und bildet in engem Kontakt mit dem helleren chromosomal Material lange, vernetzte Stränge. Gleichzeitig spielen sich die schon geschilderten Veränderungen am Nukleolus (vgl. S. 683) ab, der im Lichtmikroskop jetzt spongiöser und größer erscheint. In den folgenden Stadien (Abb. 9d, e) nimmt das Kernvolumen weiter zu und das tubuläre Material dehnt sich noch weiter aus. Das Maximum dieser Entwicklung ist etwa durch Abb. 9e dargestellt. Anschließend beginnt die Vorbereitung des Kerns auf die Teilung (Diakinese), in deren Verlauf der Nukleolus sich auflöst (Abb. 9f) und die Tubuli unter starker Verklumpung und Zerbröckelung (Abb. 9g) sich von den Chromosomen lösen [ein Stadium, das auch elektronenmikroskopisch untersucht wurde (s. oben)]. In der Metaphase (Abb. 9h) erscheint der ehemalige Kernraum, der nun von der Spindel erfüllt wird, fast leer. In der Umgebung



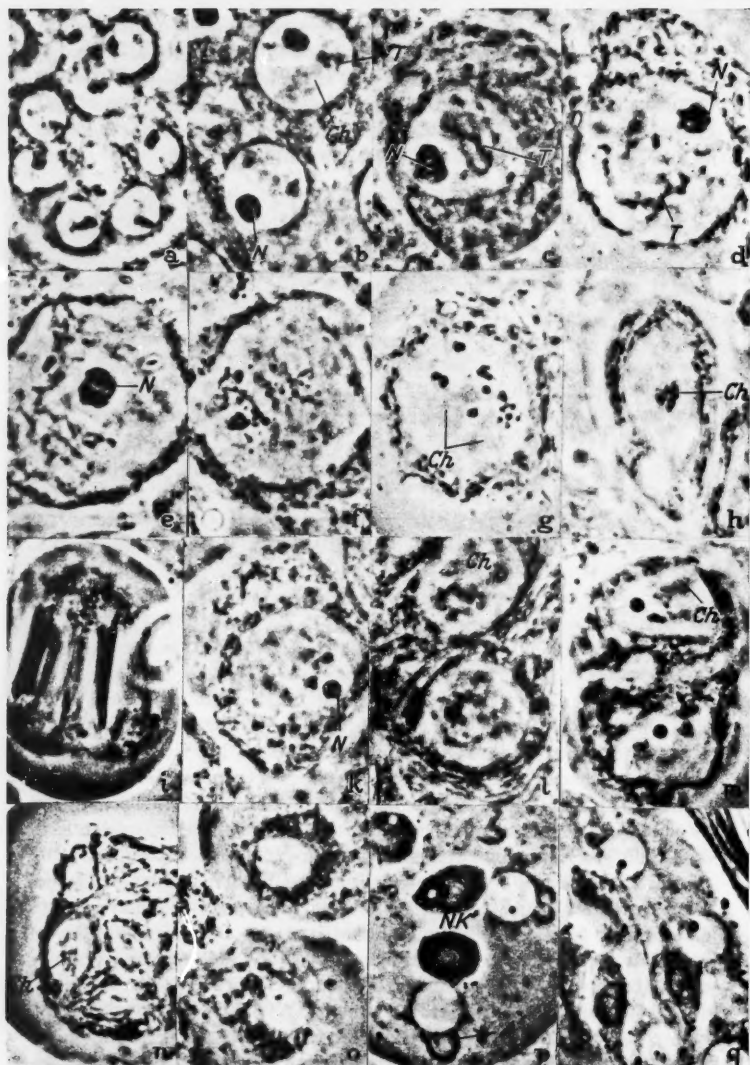


Abb. 9a—q. Lichtmikroskopische Darstellung des Meioseablaufes, Aufnahmen lebender Zellen in X/Y-Hoden, 1225  $\times$ . Erläuterung im Text S. 693. *N* Nukleolus, *Ch* Chromosomen, *T* Tubuli, *NK* Nebenkerne, *A* Akrosom



der Chromosomen ist jetzt kein dunkleres Material mehr zu erkennen. Allerdings finden sich manchmal noch einzelne Klumpen davon im weiteren Raum der Spindel. Das in Abb. 9g noch erkennbare, verklumpte tubuläre Material muß sich also inzwischen (d.h. von Beginn der Diakinese bis zur Metaphase I) entweder im Kernraum bis auf einige mögliche Restkörper (sofern diese nicht anderen Ursprungs sind) aufgelöst oder den Kernraum verlassen haben. Stark lichtbrechende Granula sammeln sich in der Anaphase an den Spindelpolen an (Abb. 9i). Es sind dies die schon beschriebenen Lamellenkörperchen (S. 687).

Die Interkinese und die zweite Reifeteilung können lichtmikroskopisch eindeutig identifiziert werden. Als Kriterien für die ruhende zweite Spermatocyte wurden Kern- und Nukleolengröße herangezogen. Eine solche Spermatocyte II ist in Abb. 9k zu sehen; Kerndurchmesser und Nukleolengröße sind deutlich geringer als in Spermatocyten I (Abb. 9d, e). Lichtoptisch dunkel erscheinendes Material (Abb. 9k, l) repräsentiert sicher keine Tubuli, denn elektronenmikroskopisch wurden in vermutlich zweiten Spermatocyten keine Tubuli gefunden (s. u.). Es könnte sich um prophasisch kontrahierte Chromosomen, um Abbauprodukte des Nukleolus oder um Stoffwechselprodukte ohne auffällige Feinstruktur handeln. Die zweite Reifeteilung läuft äußerlich ähnlich ab wie die erste Reifeteilung. Das dunklere Material verschwindet unter gleichzeitiger starker Verdichtung der Nukleolen (Abb. 9m). Dabei treten die Chromosomen deutlicher hervor. Gruppen von Metaphasen der zweiten Reifeteilung zeigt Abb. 9n, zwei Telophasen Abb. 9o. Aus den Mitochondrien, die in Abb. 9o dicht gehäuft den Kern umgeben, entsteht der Nebenkern. Im Spermatidenkern ist wieder ein dichter, runder „Nukleolus“ vorhanden (Abb. 9p, q). Ein geschichteter Nebenkern und das Akrosom sind deutlich erkennbar. In Abb. 9q schließlich streckt sich der Nebenkern, das Akrosom ist kaum noch zu sehen und die Geißel bereits gebildet.

An den Orten, die nach lichtoptisch untersuchten Parallelschnitten Spermatocyten II in der Interkinese oder Prophase zeigen sollten, finden sich im elektronenmikroskopischen Bilde Zellen mit relativ großen Kernen, die, abgesehen von feinverteilten chromosomalen Fibrillen und vom Nukleolus, keine definierten Strukturelemente enthalten. Die zweifache Kernmembran und auch die Plasmastruktur sind ähnlich wie in Spermatocyten I. Der Unterschied gegenüber ersten Spermatocyten würde also im Fehlen jeglicher strukturierter Kernkomponenten bestehen. Nur granuläres Material tritt in der Umgebung der Chromosomen reichlicher auf. Gegen eine Verwechslung mit jungen ersten Spermatocyten spricht neben der Lage dieser Zellen auch ihre geringere Größe. Außerdem wurden hier bisweilen Spindelreste und interzelluläre Brücken beobachtet; die Zellen müssen also kurz vorher eine Zellteilung durchlaufen haben. Mit Sicherheit kann ausgeschlossen werden, daß es sich um Spermatiden handelt, weil diese einen undifferenzierten, kleineren Kern und ein anders organisiertes Cytoplasma besitzen.

### III. Spermatocytenkerne von X/O-Männchen und Männchen mit Y-Fragmenten

Der hohe Stand der *Drosophila*-Cytogenetik erlaubt eine genaue Untersuchung der Frage nach dem Einfluß einzelner Chromosomen und Chromosomen-Abschnitte auf die Bildung der Tubuli und der anderen Kernkomponenten. Aus theoretischen und methodischen Gründen (vgl. Diskussion) wurden zunächst Männchen ohne Y-Chromosom und Männchen mit verschiedenen Fragmenten des Y-Chromosoms untersucht. X/O-Männchen erscheinen in der Regel äußerlich völlig normal, sind jedoch steril. Soweit die Spermiogenese lichtoptisch verfolgt werden kann, verläuft sie normal (SHEN 1932), möglicherweise mit Ausnahme der Streckung der Spermienköpfe. Trotz dieser anscheinend normalen Ausdifferenzierung sind die Spermien bewegungsunfähig (zusammenfassende Diskussion früherer Untersuchungen bei BROSSÉAU 1960). Nach den derzeitigen Kenntnissen enthält das Y-Chromosom insgesamt 7 Fertilitätsfaktoren (und zwar 2 in  $Y^S$  und 5 in  $Y^L$ ). Die von uns untersuchten Männchen mit einem Fragment des Y-Chromosoms sind ebenfalls steril, weil bereits der Verlust eines einzigen der 7 Fertilitätsfaktoren völlige Unbeweglichkeit aller Spermien zur Folge hat.

#### 1. Männchen ohne Y-Chromosom (X/O-Männchen)

a) *Lichtmikroskopische Befunde.* Schon lichtmikroskopisch sind die Spermatocytenkerne eines X/O-Hodens von den Kernen normaler X/Y-Spermatocyten leicht zu unterscheiden. Sie erscheinen auffallend leer (Abb. 10). Nur die meiotischen Prophasechromosomen, die im Lebendpräparat wenig Kontrast zeigen, sind auch hier in gleicher Anordnung und Größe sichtbar, allerdings noch stärker aufgelockert als in X/Y-Tieren. Das für die X/Y-Spermatocyten charakteristische dunkle Material, dem elektronenoptisch die Tubuli entsprechen, fehlt. In der Umgebung der Chromosomen treten vereinzelt dunklere Grana auf, aber nie in der Menge und charakteristischen Anordnung des tubulären Materials. Dagegen enthalten die ersten Spermatocyten und die weiteren Stadien sehr auffallende Bildungen, die in X/Y-Zellen nie beobachtet worden sind. Es handelt sich um Kristallnadeln, die sowohl im Kern als auch im Cytoplasma vorkommen können (Abb. 10). Die Lage dieser Kristalle innerhalb der Zelle ist ziemlich regellos. Auch ihre Länge und Anzahl sind variabel (vgl. die elektronenmikroskopischen Beobachtungen). In den späteren Stadien der Spermatogenese (erste und zweite Spermatocyten, Spermatiden, Spermien) bleiben die Kristallnadeln erhalten. Die Kristalle scheinen die Vorgänge der Zellteilung und Zelldifferenzierung nicht tiefgreifend zu stören. Anzahl und Gestalt der Kristalle in den X/O-Spermatocyten hängen auch von der genetischen Konstitution ab. Dies

gilt z.B. für die Mutation *scute*<sup>8</sup>. Sie ruft in der Spermatogenese von X/Y-Tieren keine erkennbaren Veränderungen hervor. Dagegen bilden

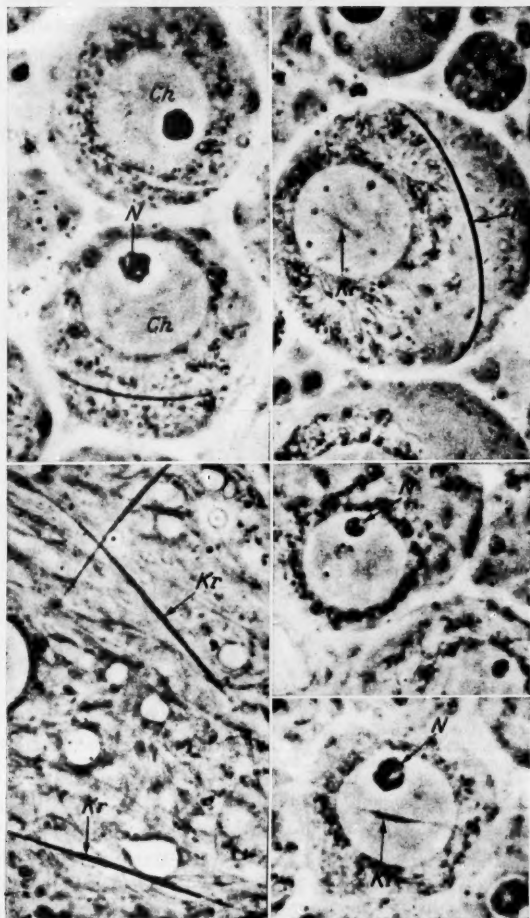


Abb. 10. Lichtmikroskopische Aufnahmen lebender Spermatocyten I in X/O-Hoden, 1225  $\times$ .  
N Nukleolus, Ch Chromosomen, Kr Kristallnadeln

sich in den  $X^{sc^8}/O$ -Spermatocyten zahlreiche feine Kristallnadeln, die im Cytoplasma häufiger sind als im Zellkern und sich oft sternförmig

zusammenlagern (Abb. 11). In den Zellkernen finden sich bisweilen auch noch einfache Kristallnadeln. Im Vergleich zu den X/O-Spermatocyten besitzen also die  $X^{sc8}/O$ -Spermatocyten zwar ungefähr die gleiche Menge kristallisierten Materials, jedoch bestehen die Kristalle statt aus einzelnen großen Nadeln aus vielen, feineren, sternförmig angeordneten Kristallnadeln.

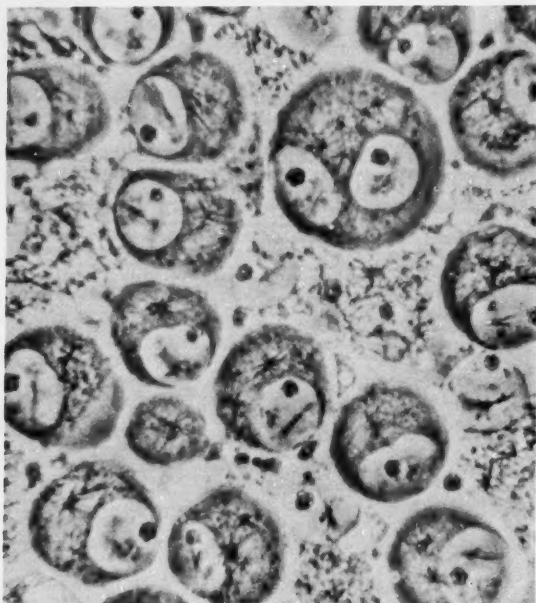


Abb. 11. Spermatocyten I in einem  $X^{sc8}/O$ -Hoden (Lebendpräparat) 2500  $\times$ , zahlreiche sternförmig angeordnete Kristalle im Cytoplasma, in den Zellkernen überwiegen Einzelkristalle

b) *Elektronenmikroskopische Befunde.* Die elektronenmikroskopische Strukturanalyse bestätigt die lichtmikroskopischen Befunde. Die X/O-Kerne enthalten in keinem Falle tubuläres Material, das mit dem in X/Y-Zellen verglichen werden kann. Der Kern junger Spermatocyten ist sehr strukturarm (Abb. 12). In der Umgebung der chromosomalen Fibrillen findet sich granuläres Material. Die Granula sind etwa 200 bis 300 AE dick und erscheinen hohl. Hier ergibt sich also eine morphologische Parallele zu den in jungen Spermatocyten normaler Tiere gelegentlich beobachteten Hohlgranula (S. 685). Ihre Menge ist aber relativ gering. Das typische retikuläre Material der X/Y-Spermatocyten scheint

in X/O-Spermatocyten ebenfalls zu fehlen. Hier und da finden sich jedoch Anfänge der Bildung von retikulären Elementen in der Umgebung der chromosomalen Fibrillen. In einem einzelnen X/O-Kreuzungsansatz wurden auch Spermatocyten mit kleinen Gruppen von

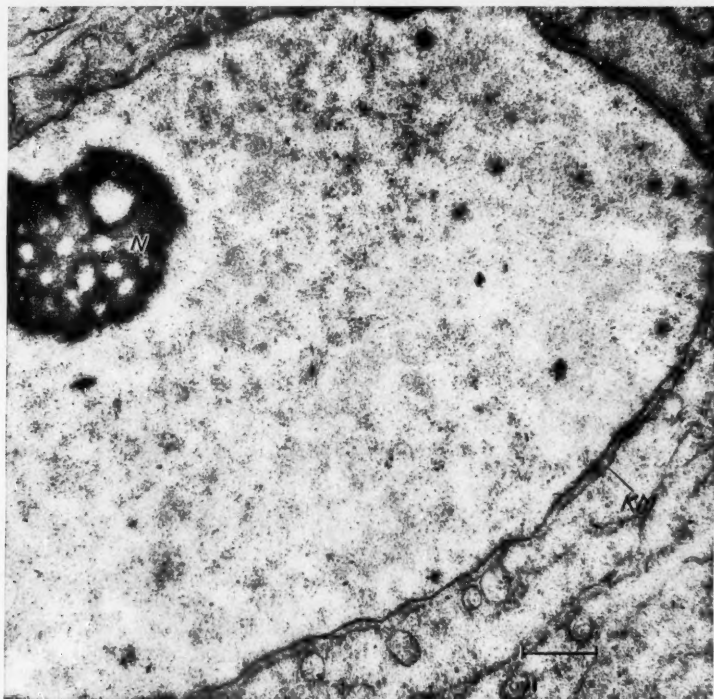


Abb. 12. Kern einer X/O-Spermatocyte I, 11400  $\times$ . Der Kern enthält keine der in Abb. 2 sichtbaren Funktionsstrukturen; N Nukleolus, KM zweifache Kernmembran

tubulärem Material beobachtet (Abb. 13). Dieses Material ist seiner Struktur nach mit den in jungen X/Y-Spermatocyten öfters beobachteten granulären Vorstufen der Tubuli verwandt.

Aus allen Befunden scheint sich zu ergeben, daß zumindest die volle Ausdifferenzierung des tubulären Materials, in der Regel aber auch schon seine Entstehung, ohne das Y-Chromosom unmöglich ist. Das gleiche gilt im Prinzip auch für die retikuläre Komponente. Andere Prozesse laufen normal weiter, z.B. die Bildung der großen Granula und der Formwechsel der Kernmembran. Außerdem kommt es in älteren X/O-

Spermatocyten noch zur Ausbildung einer zweiten, nur in diesen beobachteten Strukturkomponente. Es handelt sich um ein sehr feines, zusammenhängendes, schwammiges Retikulum, dessen nähere Charakterisierung noch aussteht (vgl. auch Abb. 18).

c) *Die Kristallnadeln.* Alle X/O-Hoden sind, wie bereits erwähnt, durch auffällige intrazelluläre (eventuell in älteren Stadien auch extrazelluläre) Kristallnadeln gekennzeichnet. Im Elektronenmikroskop erweisen sich diese Nadeln meist aus mehreren parallel liegenden Einzel-

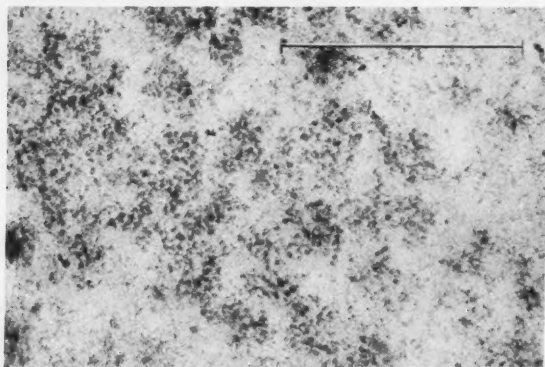


Abb. 13. Ansammlungen von Granula und ihre Aggregation zu X/O-Tubuli in einer X/O-Spermatocyte I, 30 800  $\times$

kristallen zusammengesetzt (Abb. 14). Die Feinstruktur der Einzelkristalle war bisher noch nicht auflösbar. Es scheint sich jedoch um ein fibrilläres Material zu handeln, dessen Einzelfibrillen einen Durchmesser von höchstens 100 AE haben können. Besser dagegen lassen sich im Elektronenmikroskop die Entstehungsweise und das Wachstum der Kristalle verfolgen. In den jüngsten X/O-Spermatocyten wurden Kristalle nur im Kern beobachtet. In diesen Stadien ist die Zusammensetzung der Kristalle aus langen, einzelnen Nadeln von etwa 50 bis 100  $m\mu$  Dicke besonders deutlich. Zunächst scheinen sich einzelne Nadeln zu bilden, an die sich dann weitere locker anlagern. Derselbe Vorgang kann auch für die im Cytoplasma gebildeten Kristalle angenommen werden (Abb. 14), nur daß hier die Kristallbildung generell später einzusetzen scheint als im Kern. Die intranukleären Kristallbündel können nach lichtmikroskopischen Befunden bei weiterem Wachstum die Kernmembran durchstoßen. Dieser Vorgang wird auch durch ein elektronen-

Abb. 14a u. b. Kristallnadeln in Kern und Cytoplasma von X/O-Spermatocyten. a Teil einer Kristallnadel im Cytoplasma, 28 000  $\times$ . b Bündel von Kristallnadeln im Kern, 17 500  $\times$ . Kr Kristallnadeln, KM Kernmembran, N Nukleolus, Cy Cytoplasma, K Kern



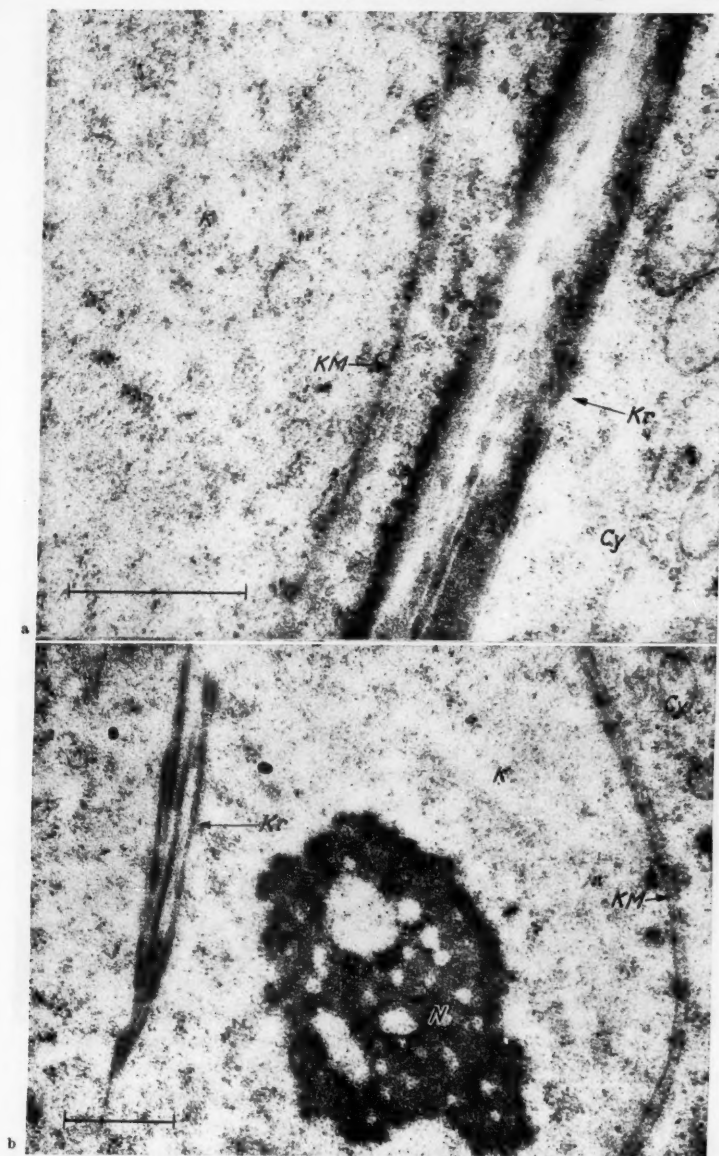


Abb. 14 a u. b (Legende S. 700)



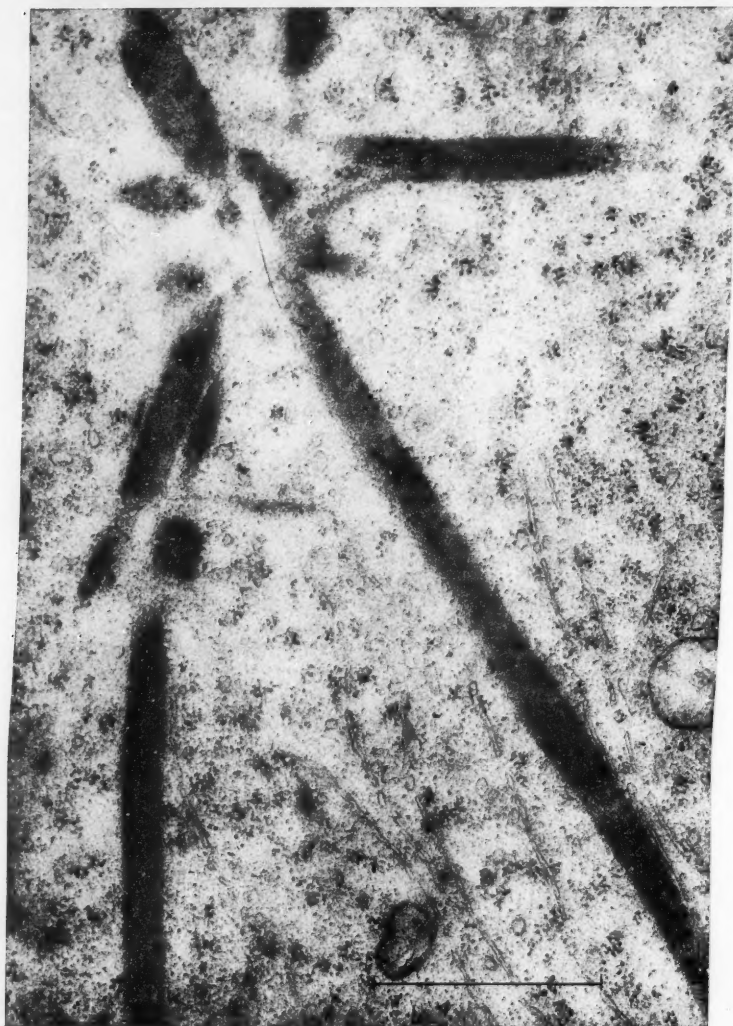


Abb. 15. Kristallstern aus einer  $X^{Sc8}/O$ -Spermatocyte I, 36100  $\times$  (vgl. Abb. 11 und Text S. 697)

mikroskopisches Bild belegt (Aufnahme leider nicht im Focus). In den älteren Spermatocyten sind die Einzelkristalle in der Regel miteinander

zu dicken homogenen Nadeln verschmolzen. Nach lichtmikroskopischen Befunden können sie in den späteren Stadien der Spermatogenese über den Bereich der Einzelzelle hinauswachsen. Spermienbündel von X/O-Hoden enthalten regelmäßig einzelne besonders lange und dicke Kristallnadeln, die diese Bündel in allen Richtungen durchbohren.

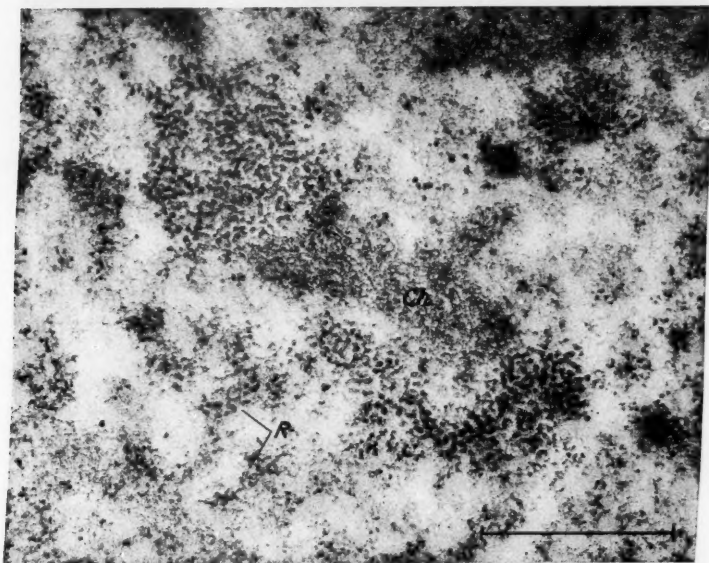


Abb. 16. Tubuli aus einer X/Y<sup>Lc</sup>-Spermatocyte I, 30 400  $\times$ . T Tubuli, CA chromosomale Fibrillen, R retikuläres Material

Die sternförmige Anordnung der Kristallnadeln in  $sc^8/O-\delta^8$  legt die Existenz von Kristall-Bildungszentren nahe. Solche Zentren lassen sich jedoch morphologisch nicht definieren (Abb. 15).

Fermentreaktionen legen nahe, daß die Kristalle aus Protein bestehen. Dabei haben Trypsin und Pepsin unter den auf S. 680 angegebenen Bedingungen, anders als bei den Tubuli, den gleichen Effekt. Beide Enzyme lösen nach kurzer Zeit die Kristallnadeln auf, die außerdem nicht basophil sind, also Nukleinsäuren nicht in nachweisbaren Mengen enthalten.

Nach Carnoy-Fixierung sind in X/O-Hoden keine Kristalle mehr sichtbar. Es besteht somit die Möglichkeit, daß diese auch in anderen sauren Fixierungsmedien aufgelöst oder tiefgreifend verändert werden. Vielleicht läßt sich so erklären, warum SHEN (1932) keine Kristalle beobachtet hat.

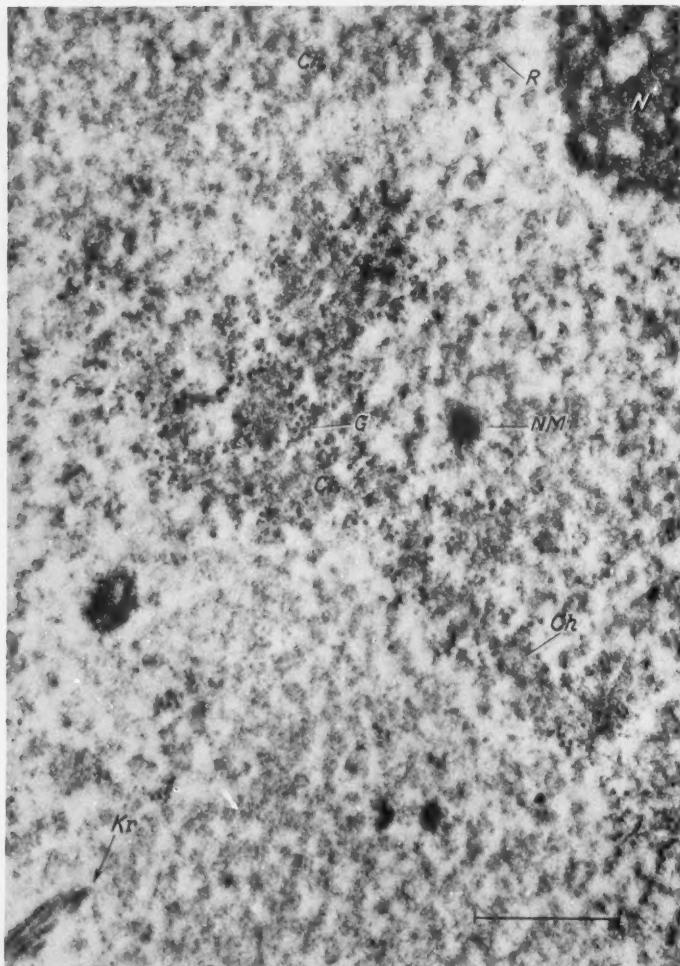


Abb. 17. Spermatocytenkern aus einem  $X/Y^S$ -Hoden, 22 800  $\times$ . *Ch* chromosomale Fibrillen, *G* granuläres Material, *NM* Material nukleolärer Herkunft, *N* Nukleolus, *Kr* Kristallnadeln, *R* retikuläres Material

## 2. Männchen ohne den kurzen Arm des Y-Chromosoms ( $X/Y^{Le}$ - und $X.Y^L$ -Männchen)

Das elektronenmikroskopische Bild von Kernen, die nur den langen Arm des Y-Chromosoms enthalten, zeigt keine wesentlichen Abwand-

lungen gegenüber dem X/Y-Typ. Tubuli und die anderen Kernkomponenten sind in ähnlicher Form, Verteilung und Menge wie in X/Y-Tieren vorhanden (Abb. 16). Da diese Tiere steril sind, kann keine

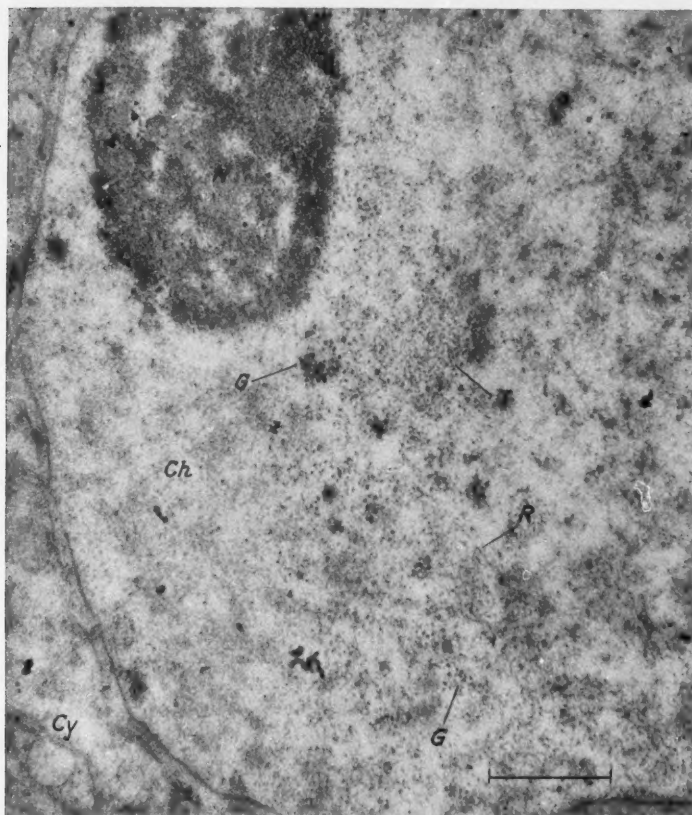


Abb. 18. Spermatocytenkern aus einem X/Y<sup>S</sup>-Hoden, intermediärer Zustand zwischen X/O-Typ und X/Y<sup>Lc</sup>-Typ, 19000  $\times$ . N Nukleolus, G Granula, T Tubuli, Ch chromosomale Fibrillen, R retikuläres Material, Cy Cytoplasma

direkte Beziehung zwischen Spermien-Beweglichkeit und Tubuliproduktion vorliegen. Die lichtmikroskopische Untersuchung ergab allerdings, daß nicht alle Spermatocyten des X/Y<sup>Lc</sup>-Hodens zum „X/Y-Typ“ gerechnet werden können. In fast allen Hoden waren einige „leere“ erste Spermatocytenkerne, also Kerne des „X/O-Typs“ zu finden. Es wurden auch Kristalle gefunden. Sie traten nicht nur im Bereich der vereinzelt

leeren, „X/O“-ähnlichen Spermatocyten auf, sondern auch in Spermien bzw. Spermatidenbündeln der proximalen Hodenabschnitte adulter X/Y<sup>Le</sup>-Tiere.

### 3. Männchen ohne den langen Arm des Y-Chromosoms (X.Y<sup>S</sup>- und X/Y<sup>S</sup>.Y<sup>S</sup>-Männchen)

Der Bau der Spermatocyten in X.Y<sup>S</sup>/O-Hoden ist weit weniger einheitlich als der in X/Y<sup>Le</sup>-Hoden. Es finden sich alle Übergänge zwischen Spermatocyten vom reinen X/O-Typ und solchen, die dem X/Y-Typ

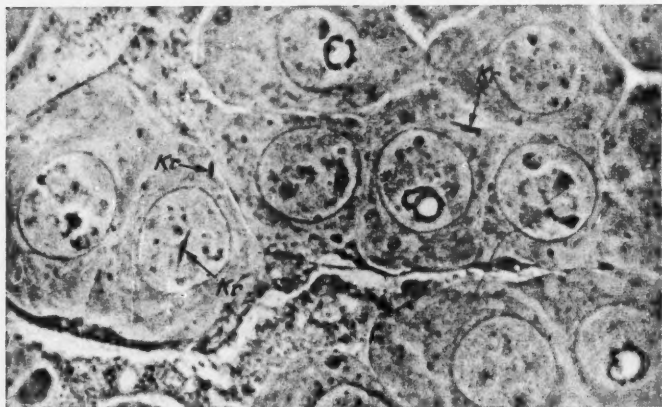


Abb. 19. Dünnschnitt (0,2  $\mu$ ) durch Spermatocyten eines X/Y<sup>S</sup>-Hodens, Phasenkontrast, Osmiumfixierung, Methacrylateinbettung, 1225 $\times$ . Variabilität der Kernstruktur, s. S. 711. Kr Kristallnadeln

sehr nahe kommen. Dabei überwiegen aber deutlich die dem X/O-Typ ähnlichen. Interessant ist hier besonders das Studium der verschiedenen Zwischenstufen. Es finden sich sehr häufig Kerne, die zwar kaum Tubuli und retikuläres Material enthalten, aber große Mengen von Granula im Bereich der Chromosomen ausbilden — deutlich mehr als in echtem X/O-Tieren (Abb. 17). Diese Zellen enthalten regelmäßig Kristalle, oft anscheinend sogar mehr als in normalen X/O-Tieren. Eine nächste Stufe wird durch Kerne vertreten, die neben größeren Mengen von Granula kleinere Anhäufungen von Tubuli und retikulärem Material erkennen lassen, aber trotzdem „noch“ intranukleäre Kristalle bilden (vgl. Abb. 18). Endlich kommen auch (selten) Spermatocyten vor, die größere Mengen von Tubuli und von retikulärem Material enthalten und in denen es dementsprechend nicht zu einer Kristallbildung kommt. Die Variabilität der Spermatocyten im Hoden der X.Y<sup>S</sup>-Männchen ist auch im lichtmikroskopischen Bild (Abb. 19) deutlich zu erkennen.

Im ganzen gesehen nehmen also die Spermatocyten im  $X.Y^S$ -Hoden eine Mittelstellung zwischen dem  $X/Y$ - und dem  $X/O$ -Typ ein. Man könnte deshalb daran denken, daß die Fähigkeit des Y-Chromosoms, die Bildung von Tubuli und anderen Kernkomponenten zu induzieren, nicht an bestimmte Abschnitte dieses Chromosoms gebunden sei, sondern daß hier eine rein quantitative Beziehung vorliege. Aber die Untersuchung von Männchen, in welchen der kurze Arm des Y-Chromosoms zweifach vorliegt ( $X/Y^S.Y^S$ ), zeigt, daß dies nicht der Fall ist (vgl. Diskussion). Die Spermatocyten dieser Konstitution weisen im Durchschnitt nicht mehr Tubuli und nicht mehr retikuläres Material auf als solche mit nur einem kurzen Arm des Y-Chromosoms. Es ist auch sonst kein merklicher morphologischer Unterschied zwischen den beiden Genotypen vorhanden. Die normale intranukleäre Differenzierung der Spermatocyten wird also ähnlich wie die Beweglichkeit der Spermien durch verschiedene Faktoren im langen wie im kurzen Arm des Y-Chromosoms bestimmt.

#### D. Diskussion

In den früheren Untersuchungen über die Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* standen Probleme des meiotischen Formwechsels und cytogenetische Fragen, wie die des Zusammenhanges zwischen Crossing-over und Chiasmen-Bildung, im Vordergrund (zusammenfassende Darstellung bei COOPER 1950). Die elektronenmikroskopische Analyse hat auf diesem Gebiet nur in einem Punkt einen Fortschritt gebracht: Die Chromosomen von *Drosophila melanogaster* bilden in der meiotischen Prophase der Spermatocyten die typischen Paarungsstrukturen („cores“, „synapteinomal complexes“, vgl. MOSES 1960) nicht aus. Damit ist vermutlich jede Möglichkeit der Entstehung von Chiasmen von vornherein ausgeschaltet, was mit den bekannten genetischen Daten (kein Crossing-over im *Drosophila*-Männchen) in Einklang steht. Die im Lichtmikroskop gelegentlich beobachteten Chiasma-artigen Konfigurationen in Spermatocyten und in Neuroblasten-Mitosen müssen, da sie nicht auf der Grundlage einer typischen meiotischen Paarungsstruktur zustande kommen, als „Pseudochiasmata“ betrachtet werden (vgl. COOPER 1950). Die Oocyten von *Drosophila melanogaster* zeigen die charakteristischen chromosomalen „cores“ (MEYER 1961), und dementsprechend findet man im weiblichen Geschlecht auch normales meiotisches Crossing-over.

Das Hauptergebnis unserer Arbeit ist die Entdeckung von submikroskopischen „Funktionsstrukturen“ in den Spermatocytenkernen von *Drosophila melanogaster*. Diese Bildungen sind, wie die Daten zeigen, Ausdruck einer phasenspezifischen Aktivität des Y-Chromosoms, wahrscheinlich unter Mitwirkung der anderen Chromosomen. Zwar ist auch in den älteren Arbeiten, z. B. bei GUYENOT und NAVILLE (1929), das Auftreten von extrachromosomalen, „pseudochromatischen“ Körpern in den ersten Spermatocyten von *Drosophila melanogaster* bemerkt worden,



doch konnte die wahre Natur dieses Materials mit der damals möglichen Technik gar nicht erkannt werden. Die Gleichsetzung der Granula mit Chromosomen, die Gegnern der Chromosomen-Theorie der Vererbung zeitweilig als Argument gegen die Zahlenkonstanz der Chromosomen gedient hat (JEFFREY und HICKS 1925), erwies sich freilich schon sehr bald als unzulässig (LEAGUE 1930, HUETTNER 1930).

GUYENOT und NAVILLE (1929) beobachteten im übrigen ganz richtig, daß das im Spermatocytenkern anfangs retikulär verteilte eosinophile oder „siderophile“ (mit Eisenhämatoxylin darstellbare) Material im Laufe der ersten Reifeteilung verklumpt oder zerfällt und sich von den Chromosomen löst. HUETTNER (1930), der erstmals die Feulgen-Reaktion angewandt hat, konnte zeigen, daß es wirklich nur dieses pseudochromatische Material ist, das im Lauf der Meiose zerfällt, während der eigentliche Chromosomenformwechsel zwar vereinfacht, aber ohne Zerfallsprozesse abläuft. Die letzte Unklarheit wird nun durch unsere Befunde behoben. Die Widersprüche in den älteren Arbeiten erklären sich dadurch, daß das tubuläre Material, das ja lichtmikroskopisch deutlich erkennbar ist und leicht mit den Chromosomen verwechselt werden kann, nach der Färbung mit dem Heidenhainschen Hämatoxylin auf Grund seiner hohen Dichte ebenso stark oder stärker hervortritt als die Chromosomen selbst, während mit der Feulgen-Reaktion nur die Chromosomen dargestellt werden. Die Tubuli und die anderen Funktionsstrukturen enthalten entweder überhaupt keine DNS oder DNS in einer für die Feulgen-Reaktion unerschwelligen Konzentration.

Der Schluß, daß es sich bei den Bildungen, die im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stehen, um „Funktionsstrukturen“ handelt, gründet sich zunächst auf ihre Phasen-Spezifität. Die Tubuli und die retikulären Elemente sind in ihrem Vorkommen mit Sicherheit allein auf das Stadium der ersten Spermatocyte, andeutungsweise vielleicht auch der zweiten Spermatocyte, beschränkt. Die Entstehung fällt zeitlich mit der Ausbildung der zweifachen Kernmembran beim Übergang von der Spermatogonie zur Spermatocyte zusammen. Der Abbau erfolgt im Zusammenhang mit der Kontraktion der Chromosomen in der Diakinese und Prometaphase I. In der Spermatocyte II. Ordnung bleibt das Auftreten von Funktionsstrukturen auf den interkinetischen Zellkern beschränkt, der ebenfalls eine zweifache Kernmembran besitzt. Welche Rolle die zweifache Kernmembran in der Physiologie des Spermatocytenkernes spielt, wissen wir nicht. Daß jedoch kein ursächlicher Zusammenhang zu der Ausbildung der intranukleären Funktionsstrukturen besteht, geht daraus hervor, daß auch X/O-Spermatocyten (und Spermatocyten anderer *Drosophila*-Species, bei welchen keine Tubuli vorkommen [noch unveröffentlicht]) eine zweifache Kernmembran besitzen. Die schnelle, fast plötzliche Ausdifferenzierung der Tubuli und kurz darauf



die der retikulären Elemente scheinen vielmehr unmittelbar durch eine Zustandsänderung der Chromosomen induziert zu werden.

Der chromosomale Ursprung der Funktionsstrukturen im Spermatocytenkern wird durch die elektronenmikroskopischen Bilder auch direkt bestätigt. Die Tubuli nehmen hier eine Sonderstellung ein, weil sie anscheinend nicht „unilokal“ entstehen, sondern über mehrere oder alle Chromosomen (zumindest das X und die zwei großen autosomalen Bivalente) verteilt liegen, wobei jedoch in allen Partien der enge Kontakt zu den chromosomalen Fibrillen gewahrt bleibt. Mit der Feststellung des innigen Kontaktes zwischen Funktionsstrukturen und Chromosomen verbindet sich eine wesentliche Frage, die vorläufig noch nicht definitiv entschieden werden kann: Soll man so differenzierte Bildungen wie die Tubuli oder die retikulären Elemente als bloße stoffliche Produkte, vergleichbar dem Nukleolus, ansehen oder beteiligt sich das Chromosom auch selbst materiell am Aufbau dieser Strukturen? Handelt es sich womöglich um spezielle Ausprägungsformen der Chromosomen-Struktur, so wie sie in den Puffs der Riesenchromosomen (BEERMANN und BAHN 1954) oder in den Schleifen der Lampenbürsten-Chromosomen (GALL 1956) vorliegen? Daß in den Funktionsstrukturen DNS nicht nachzuweisen war, beeinträchtigt diese Überlegung zunächst nicht, denn auch in den Puffs treten Proteine und RNS cytochemisch in den Vordergrund. Allerdings steht das kritische Experiment mit Desoxyribonuklease noch aus. CALLAN und MCGREGOR (1958) haben zeigen können, daß dieses Ferment die Schleifen der Lampenbürsten-Chromosomen zerstückelt: für diesen einen Fall einer „Funktionsstruktur“ ist somit die Existenz einer DNS-Achse überzeugend demonstriert. Für die Tubuli im Spermatocytenkern von *Drosophila melanogaster* hätte die Annahme, es handle sich um chromosomale Strukturmodifikationen, noch eine besondere Konsequenz: Vielleicht ist es das Y-Chromosom selber, das uns ganz oder teilweise, und eventuell zusammen mit den heterochromatischen Bereichen des X-Chromosoms und der Autosomen, in Form der „Tubuli“, „retikulären Elemente“ usw. entgegentritt. Daß das Y-Chromosom an der Entstehung dieser Elemente maßgebend beteiligt ist, daran besteht ja ohnehin kein Zweifel (s. unten). Man hätte dann zu fordern, daß das Heterochromatin, das sonst gewöhnlich kondensiert bleibt, in den Spermatocytenkernen von *Drosophila melanogaster* extrem aufgelockert ist. Tatsächlich ist in diesen Kernen ein Feulgen-positives Chromozentrum nicht einmal spurenweise nachzuweisen. Man erinnere sich ferner daran, daß das tubuläre Material in der Regel ein zusammenhängendes System von Strängen bildet und daß mit der Ablösung von den Diakinese-Chromosomen auch stets die Feinstruktur der Tubuli zusammenbricht. Wir hoffen, dieses Problem durch autoradiographische Untersuchungen klären zu können.

Worin mag die gen-physiologische Bedeutung der Tubuli und der anderen Funktionsstrukturen liegen? Sicher besteht ein enger Zusammenhang mit der Entwicklung der Spermatocyten und womöglich auch der Differenzierung der Spermatiden und Spermien. Es erscheint vorläufig noch unmöglich, diese Frage direkt, d. h. mit biochemischer Methodik, anzugehen. In dieser Situation muß zunächst einmal versucht werden, die an der Bildung der Funktionsstrukturen beteiligten Chromosomen zu ermitteln und die chromosomalen Entstehungsorte möglichst genau zu definieren. Sind diese Orte bekannt, so läßt sich über ihre Bedeutung für die Spermato- und Spermiogenese auch durch rein genetische Experimente eine Auskunft gewinnen. Solche Experimentalbefunde liegen bei *Drosophila melanogaster* für ein bestimmtes Chromosom, das Y-Chromosom, bereits seit langem vor: *Drosophila*-Männchen ohne Y-Chromosom (X/O-Männchen) sind zwar ungeschwächt lebensfähig (Ausnahmen s. S. 679), bleiben aber steril, weil die Spermien unbeweglich sind (BRIDGES 1916, SHEN 1932). Dabei hat sich eine Anzahl von Fertilitätsfaktoren lokalisieren lassen, die sich sowohl auf den langen wie auf den kurzen Arm des Y-Chromosoms verteilen (STERN 1929, NEUHAUS 1939, BROSSAU 1960). Im Hinblick auf unsere Ergebnisse erscheint es dabei von vornherein als besonders bemerkenswert, daß diese „Fertilitätsfaktoren“ in dem gleichen Zelltyp phasenspezifisch wirken, in dem auch die Tubuli usw. als phasenspezifische Bildungen auftreten. Die elektronenmikroskopische Prüfung der Spermatocyten von X/O-Männchen oder von sterilen Männchen, denen ein Teil des Y-Chromosoms fehlt, lag deshalb nahe. Sie bot sich aber auch aus methodischen Gründen an, denn nur das Y-Chromosom läßt sich ohne Schaden für die Tiere nach einem einfachen Kreuzungsschema aus dem Genom der Männchen eliminieren. Die Resultate der Untersuchungen an X/O-Männchen haben unsere Erwartungen im großen und ganzen überraschend bestätigt. Die Spermatocytenkerne von X/O-Männchen enthalten keine Tubuli und kein retikuläres Material; auch ein Teil der übrigen Komponenten des X/Y-Spermatocytenkernes scheint zu fehlen. Die Tatsache, daß dabei der meiotische Formwechsel der Chromosomen in den X/O-Spermatocyten trotzdem ganz unbeeinflußt bleibt (jedenfalls haben wir bis zur zweiten Reifeteilung keine Änderungen bemerken können, vgl. auch SHEN 1932), demonstriert einmal mehr den gen-physiologischen Charakter der Funktionsstrukturen. Vor allem aber wird die entscheidende Rolle der Chromosomen, in erster Linie des Y-Chromosoms, bei der Entstehung dieser Strukturen durch die Befunde an den X/O-Spermatocyten deutlich vor Augen geführt. Über die Art und Weise, wie das Y-Chromosom an der Bildung der Tubuli (und der anderen Funktionsstrukturen) beteiligt ist, lassen die Befunde mit den X/O-Tieren freilich noch alle der schon oben genannten Möglichkeiten

offen. Wenn man der ausnahmsweisen Beobachtung von „Tubuli“ bei X/O-Tieren (in ganz geringer Menge und nur in einzelnen Zellen) überhaupt Beweiskraft zusprechen will, so mag man darin zwar ein Argument gegen eine unmittelbare Beteiligung des Y-Chromosoms und auch gegen die Annahme sehen, die Tubuli seien eine Art von chromosomaler Strukturmodifikation, doch ist die Beteiligung anderer, besonders der im X-Chromosom gelegenen Heterochromatin-Abschnitte keinesfalls unwahrscheinlich. Auch kann man im Einzelfall niemals einen vorhergegangenen Austausch zwischen X- und Y-Chromosom ganz ausschließen (ein „X/O“-Tier könnte ausnahmsweise die Konstitution X/„Y-partiell“ besitzen).

Die Beobachtungen an den Männchen, die nur ein Teilstück des Y-Chromosoms besitzen, führen hier weiter. Sie zeigen, daß zumindest die Tubuli nicht durch die Aktivität eines einzigen Ortes im Y-Chromosom zustande kommen, denn sowohl die  $X/Y^L$ - wie die  $X/Y^S$ -Spermatocyten sind zur Bildung von Tubuli (und anderen Funktionsstrukturen) befähigt. Außerdem deutet sich eine quantitative Beziehung an, denn  $X/Y^L$ -Spermatocyten bilden regelmäßiger und in größerer Menge Tubuli als die  $X/Y^S$ -Spermatocyten. Eigenartig erscheint jedoch die starke Variabilität von Zelle zu Zelle, die die beiden genannten Genotypen im Gegensatz zu X/Y- oder X/O-Hoden besonders kennzeichnet. Zwar ist in den  $X/Y^S$ -Spermatocyten der Kern vom „X/O“-Typus die Regel, aber es gibt auch Kerne mit größeren Mengen von Tubuli; umgekehrt verhält es sich mit  $X/Y^L$ -Spermatocyten. Diese Art von „Scheckung“ (Variegation) findet in der Funktionstüchtigkeit der Spermien von  $X/Y^S$ - und  $X/Y^L$ -Männchen freilich keine Parallele; die Spermien sind, soweit wir wissen, alle unbeweglich. BROUSSEAU (1960) beschreibt neuerdings jedoch das Vorkommen von semisterilen Y-Mutanten, so daß eine Manifestation der Schwankungen auf der Ebene der Spermiogenese nicht unmöglich erscheint. Wie läßt sich nun die in den  $X/Y^S$ - und  $X/Y^L$ -Spermatocytenkernen beobachtete Variabilität mit den oben geäußerten Vermutungen über die Entstehungsweise der Funktionsstrukturen vereinbaren? Der quantitative Charakter der Schwankungen legt zunächst den Gedanken an Produktivitätsschwankungen irgendwelcher Art besonders nahe; doch kennen wir auch chromosomale Strukturmodifikationen, deren Ausprägungsgrad in Zellen ein- und desselben Organs erheblich variiert (BEERMANN 1952). Bei der Annahme von Produktivitätsschwankungen hätte man entweder an das Y-Chromosom selber ( $Y^S$  bzw.  $Y^L$ ) oder an Syntheseorte in den übrigen Chromosomen zu denken, letzteres besonders deshalb, weil das tubuläre Material sich über alle Chromosomen erstreckt. In dem einen Falle würde die Aktivität der im Y-Chromosom angenommenen Syntheseorte schwanken, in dem anderen Falle würden die im Y-Chromosom zu fordernden „Induktions-Orte“

in ihrer Induktionsleistung variieren bzw. die Syntheseorte in den anderen Chromosomen würden autonomen Schwankungen unterworfen sein. Die beobachtete Variabilität ließe sich aber, wie schon gesagt, auch ohne weiteres unter der Voraussetzung verstehen, daß die Tubuli eine „Strukturmodifikation“ des Y-Chromosoms oder wesentlicher Teile des Y-Chromosoms darstellen. Die Schwankungen würden dann als Aktivierungs-Schwankungen aufzufassen sein, die sich bei Y-Mutanten unter Umständen stärker bemerkbar machen als in normalen Y-Chromosomen. Der Gedanke an einen bestimmten Typus des genetischen „Positions-Effektes“ liegt hier besonders nahe, den sog. „variegated-type“ Positions-Effekt. Dieser Effekt manifestiert sich nicht in allen Zellen des Individuums, sondern verteilt sich in Form einer ganz unregelmäßigen Schekung (Variegation); er setzt stets Chromosomen-Mutationen voraus, an welchen das Heterochromatin beteiligt ist, und seine Manifestation hängt stark vom Y-Chromosom ab (vgl. LEWIS 1950). Auch hier denkt man gewöhnlich an Aktivierungsschwankungen, Änderungen im „Status“ der betroffenen Genorte. Vielleicht stehen die in unseren Versuchen erfaßten Fragmente des Y-Chromosoms ebenfalls unter der Einwirkung einer Art von Positionseffekt, der die Realisierung einer an sich vorhandenen Tendenz zur Strukturmodifikation mehr oder minder verhindert.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse mit den  $X/Y^S.Y^S$ -Männchen besonders aufschlußreich. Gleich ob das mutierte Y-Chromosom in diesem Fall zwei kurze Arme oder den kurzen Arm zusammen mit einem Stück des langen Armes repräsentiert, eigentlich müßte das Bild doch gegenüber  $Y^S$  in Richtung auf den  $Y^L$ -Typus verschoben sein. Daß das nicht der Fall ist, läßt zweierlei Deutungen zu: Entweder ist das Chromosom wirklich kein  $Y^S.Y^S$  [so wie es STERN (1929) ursprünglich angenommen hatte], sondern besitzt einen zweiten Arm, der zur Bildung von Tubuli nicht befähigt ist; oder aber die Wirkung der beiden Arme summiert sich nicht, und das heißt, daß beide der gleichen Hemmung unterliegen. Vielleicht läßt sich die ganze Frage durch Untersuchung weiterer Y-Mutationen und durch Änderung der Außenbedingungen schließlich beantworten.

Daß mit der Entdeckung der Tubuli und der anderen Funktionsstrukturen ein wesentliches Gebiet der Spermatocytenphysiologie und -entwicklung aufgetan worden ist, ergibt sich schließlich auch aus dem Auftreten von Eiweißkristallen in den X/O-Spermatocyten. Diese Proteinkristalle sind aus zwei Gründen besonders bemerkenswert. Erstens finden sie sich anfänglich nur in den Kernen und bilden sich dort zur gleichen Zeit, wenn in X/Y-Spermatocyten die Tubuli entstehen. Zweitens ist ihr Vorkommen nicht direkt an den X/O-Genotypus, sondern eher an den X/O-„Phänotypus“ gebunden, d. h. immer dann, wenn die

Bildung der Tubuli ausfällt oder weitgehend gehemmt ist, treten die Kristalle auf — zunächst im Kern und später im Cytoplasma. Dies zeigen die Verhältnisse bei  $X/Y^S$  und  $X/Y^L$  sehr deutlich, da hier in bezug auf die Tubuli zwischen dem  $X/Y$ -Typus und dem  $X/O$ -Typus der Spermatocytenkerne alle Übergänge vorkommen. Nur sehr selten sind im gleichen Zellkern neben wenigen Tubuli auch einige wenige Kristalle beobachtet worden. Es liegt also der Schluß nahe, in den Kristallen ein Material zu sehen, das in den normalen  $X/Y$ -Spermatocyten zum Aufbau der Tubuli und der anderen Funktionsstrukturen verwendet wird und das sich nun in Abwesenheit des  $Y$ -Chromosoms in anderer Form kristallisiert. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, daß das Protein der Tubuli auf Pepsin viel weniger anspricht als das Protein der Kristalle. Auch scheint das kristalline Material seiner Menge nach ein Mehrfaches der Tubuli und der anderen Funktionsstrukturen auszumachen. Man hat deshalb mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Kristalle Zwischenprodukte einer Synthesekette darstellen, die normalerweise unter Mitwirkung des  $Y$ -Chromosoms bzw. der Tubuli gleich weiterverarbeitet werden. Es sind aber auch andere Erklärungen denkbar. Dabei verdient besonders die Tatsache Beachtung, daß in den ausdifferenzierten Spermien von  $X/O$ -Männchen alle wesentlichen cytoplasmatischen Strukturelemente und Organellen vorhanden sind, wenn auch ihre Anordnung und Größe abgeändert sein kann (eigene unveröffentlichte Untersuchungen).

Die Untersuchungen an den Spermatocytenkernen von *Drosophila melanogaster* stehen heute noch in ihrem Anfang. Es ist zu hoffen, daß mit den Mitteln der elektronenmikroskopischen Strukturanalyse, der Cytochemie und der klassischen Genetik der Einblick in die Prozesse der Gametogenese und insbesondere ihren gen-physiologischen Hintergrund noch wesentlich vertieft werden kann. Dabei müssen auch die Verhältnisse bei den näheren und fernerer Verwandten von *Drosophila melanogaster* zum Vergleich herangezogen werden. Entsprechende Arbeiten sind bereits eingeleitet.

#### Summary

1. Morphological manifestations of the chromosomal metabolism have been found in the first spermatocyte nucleus of *Drosophila melanogaster*. These "metabolic structures" include several types of well defined components, among which the „tubuli“ and the „reticular elements“ are most conspicuous. The metabolic nature of these elements follows from their phase specificity and from cytochemical data.

2. Masses of tubuli of 300–400 Å diameter are found all over the meiotic prophase chromosomes in the spermatocyte nucleus, but not

in the spermatogonial nucleus. The reticular elements appear somewhat later and usually form a single group. Both types of metabolic structures are decomposed during diakinesis when they separate from the chromosomes.

3. The tubuli are mainly composed of a basic protein. In addition they seem to contain RNA. The presence of DNA in small concentration can not yet be excluded.

4. The chromosomal origin of the tubular as well as the reticular elements follows not only from the observed contact with the chromosomes but also from the fact that spermatocyte nuclei of X/O-males of *Drosophila melanogaster* do not contain these components. This shows that the Y-chromosome is involved.

5. The role of the Y-chromosome in the formation of the metabolic structures has been further elucidated by studying males with partial Y-chromosomes, such as  $Y^S$ ,  $Y^L$ , and  $Y''$ . Spermatocytes with the long arm of the Y ( $X/Y^{Lc}$ ) as a rule contain tubular and reticular elements in nearly normal quantity.  $X/Y^S$  and  $X/Y''$  testes show a highly variable pattern. Some spermatocyte nuclei resemble the X/O-type while the rest represent all intermediate stages between the X/O- and the  $X/Y^L$ -type.

6. The lack of tubuli in X/O or in  $X/Y^S$  and  $X/Y^L$  spermatocyte nuclei is always correlated with the appearance of crystal needles in the nucleus as well as in the cytoplasm. Only very rarely in  $X/Y^S$  spermatocytes is an intranuclear crystal found together with a small amount of tubuli. The X/O crystal needles persist during spermatogenesis and are still found in sperm bundles. The crystal material seems to be a protein which is different from the tubular protein.

7. The possibilities of the involvement of the Y-chromosome in the formation of the metabolic chromosomal structures are discussed. It seems probable that tubuli represent a highly modified state of the Y-chromosome, or parts of this chromosome. The formation of protein crystals in X/O-spermatocytes indicates the presence of a biochemical block. The relation to fertility i.e. sperm motility is unclear.  $X/Y^L$  males do not produce motile sperms although tubuli are regularly present in spermatocyte nuclei.

#### Literatur

- BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma (Berl.) 5, 139—198 (1952).  
—, u. G. F. BAHR: The submicroscopic structure of the Balbianiring. Exp. Cell Res. 6, 195—201 (1954).

- BERNHARD, W., et E. DE HARVEN: L'ultrastructure du centriole et d'autres éléments de l'appareil achromatique. Verh. 4. Int. Kongr. Elektr. Mikr., Berlin, S. 217—227, 1960.
- BRIDGES, C. B.: Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. Genetics 1, 1—52, 107—163 (1916).
- BROSSEAU, G.: Genetic analysis of the male fertility factors on the Y-chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics 44, 257—274 (1960).
- CALLAN, H. G., and H. C. MCGREGOR: Action of deoxyribonuclease on lampbrush-chromosomes. Nature (Lond.) 181, 1479—1480 (1958).
- COOPER, K. W.: Normal spermatogenesis in *Drosophila*, in M. DEMEREC, Biology of *Drosophila*. New York: J. Wiley 1950. — Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially Xh and Y) in *Drosophila melanogaster* and the theory of „heterochromatin“. Chromosoma (Berl.) 10, 535—588 (1959).
- GALL, J.: On the submicroscopic structure of chromosomes. Brookhaven Symp. in Biol. 8, 17—32 (1956).
- GRELL, K. G., u. K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an dem Dinoflagellaten *Amphidinium elegans* n.sp. Z. Zellforsch. 47, 7—17 (1957).
- GUYENOT, E., et A. NAVILLE: Les chromosomes et la réduction chromatique chez *Drosophila melanogaster*. Cellule 39, 27—81 (1929/30).
- HERZBERG, K.: Eine Ergänzung der Viktoriablaufärbung. Zbl. Bakt., 160, 481—485 (1953/54).
- HUETTNER, A. F.: The spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforsch. 11, 615—637 (1930).
- JEFFREY, E. C., and G. C. HICKS: Evidence as to the so-called mutations in *Drosophila*. Genetics 7, 273—286 (1925).
- ITO, S.: The lamellar systems of cytoplasmic membranes in dividing spermatogenic cells of *Drosophila virilis*. J. biochem. biophys. Cytol. 7, 433—442 (1960).
- KAUFMANN, B. P.: Interchange between X- and Y-chromosomes in attached X-females of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 19, 830—838 (1933).
- LEAGUE, B. B.: The normality of the maturation divisions in the male *Drosophila melanogaster*. Science 71, 99 (1930).
- LEDUC, E., et W. BERNHARD: Essais de cytochimie ultrastructurale. Digestion par la Ribonucléase. C. R. Acad. Sci. (Paris) 250, 979—981 (1960).
- LEWIS, E. B.: The phenomenon of position effect. Advanc. Genet. 3, 73—115 (1950).
- MEYER, G. F.: The fine structure of spermatocyte nuclei of *Drosophila melanogaster*. Proc. Eur. Reg. Conf. Electr. Micr. 1960, II, p. 951—954, 1961.
- MOSES, M. J.: Patterns of organisation in the fine structure of chromosomes. Verh. 4. Int. Kongr. Elektr. Mikr., Berlin 1958, S. 199—211. 1960.
- MULLER, H. J.: The construction of several new types of Y-chromosomes. DIS 22, 73—74 (1948). — The use of rearranged X's and Y's in facilitating class work with *Drosophila*. DIS 23, 110—111 (1949).
- NEUHAUS, M. J.: Crossing over between the X- and Y-chromosomes in the female of *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 71, 265—275 (1936). — A cytogenetic study of the Y-chromosome of *Drosophila melanogaster*. J. Genet. 37, 229—254 (1939).
- PAPPAS, G. D., and PH. W. BRANDT: Helical structures in the nuclei of free-living amoebas. Verh. 4. Int. Kongr. Elektr. Mikr., Berlin 1958, S. 244—246. 1960.
- RIS, H.: Die Feinstruktur des Kerns während der Spermiogenese. 9. Mosbacher Colloquium. S. 1—3. Springer: Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.



- RUTHMANN, A.: The fine structure of the meiotic spindle of the crayfish. J. biophys. biochem. Cytol. 5, 177—180 (1959). — Die mikroskopische Untersuchung von Methacrylatschnitten. Zeiss-Mitt. 2, 155—162 (1961).
- SHEN, T. H.: Zytologische Untersuchungen über Sterilität bei Männchen von *Drosophila melanogaster* und bei F<sub>1</sub>-Männchen der Kreuzungen zwischen *Drosophila simulans*-Weibchen und *Drosophila melanogaster*-Männchen. Z. Zellforsch. 15, 547—580 (1932).
- STERN, C.: Untersuchungen über Aberrationen des Y-Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 51, 253—353 (1929).

Dr. GÜNTHER F. MEYER,  
Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. BEERMANN  
Tübingen, Spemannstr. 34

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe

## ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN CHROMOZENTREN VON URTICA PILULIFERA

Von

WOLF ROSSNER\*

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. September 1961)

### Einleitung

Wie neuere licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, werden über den Feinbau von Chromozentren unterschiedliche Angaben gemacht. Nach den grundlegenden Arbeiten von HEITZ (1929, 1933) über Chromozentren und nach den Beobachtungen über ihren Formwechsel in der Endomitose (vgl. GEITLER 1953) war auf Grund des unterschiedlichen Verhaltens mit verschiedenem Heterochromatin auch innerhalb eines Zellkernes zu rechnen, doch bedarf diese Frage noch einer genaueren Klärung. Die großen Unterschiede, die an elektronenmikroskopischen Schnittpräparaten gewonnen wurden und von einem amorphen Aspekt (YASUZUMI 1960) über die Betonung der granulären Komponente (THOENES 1961) bis zur Schraubenstruktur analog dem chromosomalen Material (ROSSNER 1959, PEVELING 1961) reichen, dürfen allerdings nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden, da sie an sehr verschiedenem tierischem und pflanzlichem Material gewonnen wurden.

Besonders in den Vordergrund sei hier die Beziehung zwischen Chromatin bzw. Heterochromatin am oder im Nucleolus gerückt. Bezüglich der lichtmikroskopischen Beobachtungen über die Verteilung von Chromatin im Nucleolus, wie sie von LETTRÉ und SIEBS formuliert wurden, oder auch das „nucleolus-associated chromatin“ von CASPERSSON oder „Randkörperchen“ nach VOGT, sei auf die zusammenfassende Darstellung von HERTL (1957) verwiesen.

Bei der Beurteilung elektronenmikroskopischer Schnittbilder wies BOPP-HASSENKAMP (1960) auf die Schwierigkeiten hin, die sich durch die „erstaunliche Gleichheit der fädigen Elemente im Kernraum und im Nucleolusraum“ ergeben. Heterochromatin kann darüber hinaus nach  $\text{OsO}_4$ -Fixation eine ähnlich kompakte Lagerung und starken Kontrast wie der Nucleolus zeigen. Immerhin konnten bei *Sinapis alba* die Chromozentren am Nucleolus gut identifiziert werden, und nach der Altmannschen Fixation waren zwei Typen unterscheidbar (ROSSNER 1959). PEVELING kam an *Cucumis sativus* zu einem ähnlichen Ergebnis.

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Da sich die Kontrastierungseigentümlichkeiten der Chromozentren mit ungepuffertem Altmannschen Gemisch auch bei Nachkontrastierungsversuchen gut zur Differenzierung von Eu- und Heterochromatin bewährten (ROSSNER 1961), sollten nun mit dieser Methode spezielle Fragen aufgegriffen werden. Die Wahl des Materials fiel auf *Urtica pilulifera*, da hier Zahl und Größe der Chromozentren besonders günstig erschienen und der Kontakt zwischen Chromozentren und Nucleolus, der von TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA (1953) lichtmikroskopisch bereits eingehend an verschiedenen Haartypen dieser Pflanze beschrieben wurde, einer sublichtmikroskopischen Klärung bedurfte.

### Material und Methode

Die Untersuchungen wurden an Wurzelspitzen von *Urtica pilulifera* durchgeführt. Samen wurden in Petrischalen zum Keimen gebracht und nach 4–5 Tagen die 2–3 mm langen Wurzelspitzen fixiert. Als Fixationsgemische dienten: 1. 1%ige veronalacetatgepufferte  $\text{OsO}_4$ -Lösung von pH 7,2 (2 Std) und 2. ein ungepuffertes  $\text{OsO}_4$ -Kaliumbichromat-Gemisch nach ALTMANN (17 Std). In beiden Fällen wurde mit 1%igem Uranylacetat nach STRUGGER (1956) nachkontrastiert. Nach der Entwässerung über die Alkoholreihe erfolgte Einbettung in üblicher Weise in Methacrylat. Als Ultramikrotom stand ein Leitz-Gerät zur Verfügung; die elektronenoptischen Aufnahmen wurden bei 60 kV mit einem Siemens UM 100 angefertigt.

### Ergebnisse

#### 1. Koordination licht- und elektronenmikroskopischer Beobachtungen

Das zur Fixierung gelangte Material umfaßte nicht nur Urmeristemzellen, sondern auch in Differenzierung begriffene Plerom- und Periblemzellen sowie Dermatogen. Es mußte daher damit gerechnet werden, daß nicht nur diploide, sondern mindestens noch tetraploide Zellkerne erfaßt wurden. Da in den Zellkernen eine relativ große Menge an Heterochromatin vorkommt, wurden in jedem Ultradünnschnitt mehrere Chromozentren angeschnitten. Lichtmikroskopisch waren sieben große und eine größere Anzahl kleiner Chromozentren nachweisbar. Ein direkter Vergleich zwischen licht- und elektronenmikroskopisch sichtbarem Heterochromatin war nur in den Fällen möglich, wo ihm charakteristische Eigenschaften zukam. Diese Bedingung traf für die am Nucleolus liegenden und zwei unmittelbar aneinander haftende Chromozentren zu (vgl. Abb. 1).

Die Messungen ergaben für das mit gepuffertem  $\text{OsO}_4$  fixierte Material in elektronenmikroskopischen Bildern die gleichen Werte wie bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen der mit Flemming-Heitz (nach ROMEIS 1948) fixierten Zellkerne. Der Durchmesser der beiden am Nucleolus liegenden Chromozentren betrug danach etwa  $0,5 \mu$ , die vier in das Kernkörperchen hineinragenden hatten eine Größe von  $1,0 \times 0,5 \mu$ , während das doppelte Chromozentrum  $1,0$  bzw.  $0,3 \mu$  im Durch-

messer betrug. Nach Fixation mit Altmanschem Gemisch wurden Werte gemessen, die linear um etwa ein Drittel höher lagen, doch soll auf diese Quellungserscheinung im Zusammenhang mit der sublichtmikroskopischen Feinstruktur näher eingegangen werden. Die kleineren, in diploiden Zellkernen  $0,3-0,4 \mu$  großen, gelegentlich in Reihen angeordneten Chromozentren fanden sich in elektronenmikroskopischen Schnittbildern in weit geringerer Zahl, als nach lichtmikroskopischen

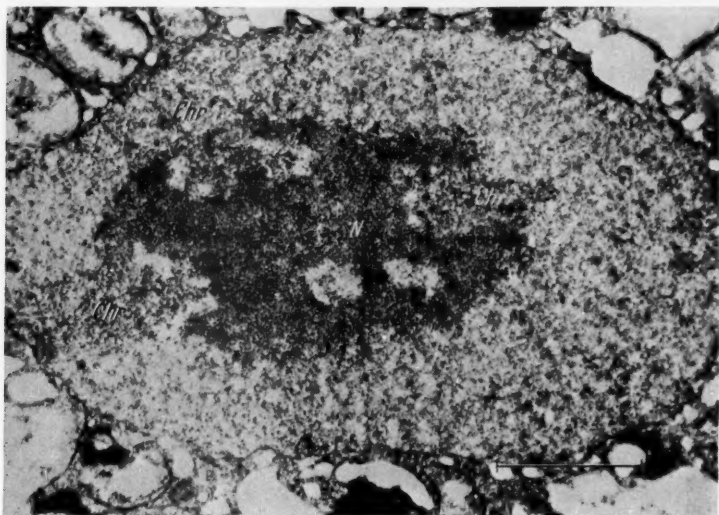


Abb. 1. Zellkern mit drei in den Nucleolus (N) hineinragenden Chromozentren (Chr). Chr' zeigt das Chromozentrum mit geteilten Fortsätzen. Fix. OsO<sub>4</sub>; Pr.-Vergr. 7500  $\times$ , Endvergr. 22000  $\times$

Untersuchungen erwartet werden durfte. Darüber hinaus ergaben sich Anhaltspunkte für Chromozentren, die erst als Sammelchromozentren polyploider Zellkerne in den Bereich lichtmikroskopischer Beobachtungsmöglichkeit gelangen (Abb. 5).

## 2. Die sublichtmikroskopische Feinstruktur

In keinem der angeschnittenen Chromozentren wurden sublichtmikroskopische Strukturen gefunden, die sich prinzipiell von denen im Euchromatin unterschieden. Die Messungen ergaben im Euchromatin nach OsO<sub>4</sub>-Fixation für die Subchromonemata oder Elementarfibrillen (MARQUARDT, LIESE und HASSENKAMP 1956) 115–130 Å und die Chromo-

nemata 500—550 Å. Die Ganghöhe der permanenten Schrauben der Subchromonemata schwankte zwischen 200 und 350 Å.

In den heterochromatischen Bezirken waren die Differenzen größer. Für die Subchromonemata wurden dort Fibrillendurchmesser von 130 bis 155 Å gemessen, und die Chromonemata besaßen zwei Maxima zwischen 510—570 Å und 850—1150 Å. Die Ganghöhen lagen hier zwischen 120 und 300 Å. Die deutlich stärkere Aufschraubung in den Subchro-

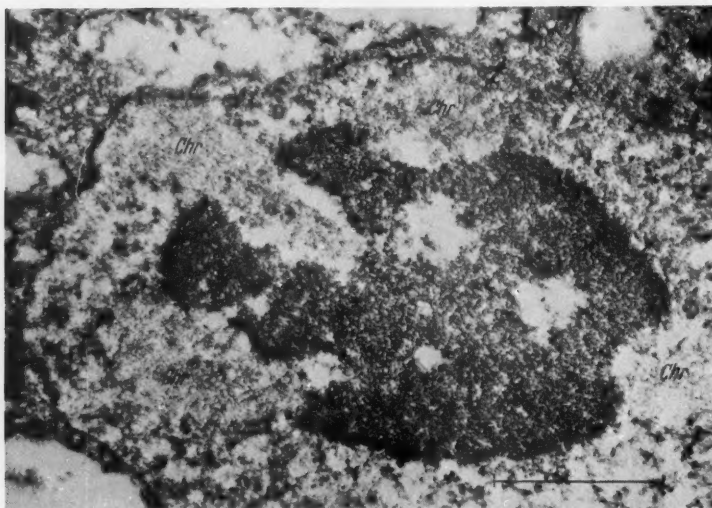


Abb. 2. Zellkern mit vier in den Nucleolus hineinragenden Chromozentren nach Fixation mit Altmann'schem Gemisch. Pr.-Vergr. 7500 ×, Endvergr. 25000 ×

monemata war auch in den kleinsten, nur  $0,2 \times 0,1 \mu$  großen Chromozentren nachweisbar. Unterschiede zwischen einzelnen Chromozentren schienen nicht vorzuliegen.

Um die Möglichkeit einer klaren Abgrenzung der Chromozentren gegen den Nucleolus zu haben, wurden auch mit ungepuffertem Altmann'schem Gemisch fixiert, wobei ebenfalls eine Nachkontrastierung mit Uranylacetat durchgeführt wurde. Die Kontraststeigerung im Euchromatin war dabei mit einer Quellung der Strukturen verbunden, wie sie von BOPP-HASENKAMP (1959) an anderen Objekten bereits beschrieben wurde. Im Nucleolus führte dieser Quellungs Vorgang zu einer Überkontrastierung und damit zur Maskierung von Einzelheiten. Die Chromozentren dagegen erlitten eine Kontrastminderung bei gleichzeitiger

Quellung. Diese Erscheinung wurde bei allen Chromozentren, einschließlich der lichtmikroskopisch nicht sichtbaren, jedoch nicht bei den am Nucleolus liegenden (Abb. 4) beobachtet. Im Heterochromatin mit vermindertem elektronenoptischem Kontrast konnten fast niemals schraubig aufgewundene Fibrillen in der Größenordnung von Chromonemata festgestellt werden. Die Schraubenwindungen der Subchromonemata verliefen unregelmäßig und großräumig, oder an ihre Stelle traten undeutlich kontrastierte und ungeordnete Fibrillensegmente. Die Interfibrillarräume waren deutlich vergrößert.

### 3. Die Chromozentren in Verbindung mit dem Nucleolus

Von den direkt am Nucleolus liegenden Chromozentren ragten vier in die Nucleolussubstanz hinein, eine Erscheinung, die von TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA lichtmikroskopisch als fadenförmige Fortsätze beschrieben wurde. In Ultradünnschnitten konnten diese Chromozentren gelegentlich in einem Schnitt beobachtet werden, da sie nahezu in einer Ebene lagen (Abb. 1). Ihre Abgrenzung gegen das Nucleolus-Material bereitete in Präparaten, die nach ALTMANN fixiert wurden, keine Schwierigkeiten (Abb. 2). Es fiel eine optisch leere Zone zwischen Chromozentren und Nucleolus auf, die sich bei beiden angewendeten Fixierungsmitteln, jedoch nicht regelmäßig, zeigte (Abb. 3).

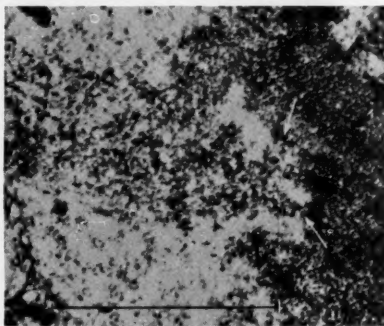


Abb. 3. Ausschnitt aus einem Chromozentrum mit Fortsätzen in den Nucleolus. Die umeinandergewundenen schraubigen Fibrillen in der Größenordnung von Subchromonemata und ihr getrennter Eintritt in das Kernkörperchen (Pfeile) sowie die optisch leere Zone sind zu erkennen. Fix. OsO<sub>4</sub>; Pr.-Vergr. 7500 ×, Endvergr. 36000 ×

Während eines der Chromozentren nur gering in den Nucleolus hineinragte und ihn schalenförmig eindellte, drangen zwei weitere diametral liegende bis zu  $1\mu$  in die Nucleolussubstanz ein. Die Längsachse der Chromozentren mit den engaufgeschraubten Subchromonemata war gegen den Nucleolus gerichtet. Vor den Kontaktstellen spreizten sich die Subchromonemata auseinander, wobei sie zwischen sich einen optisch leeren Raum ließen, um dann in den Nucleolus einzutreten, indem sie manchmal noch ein Stück verfolgt werden konnten (Abb. 3). Ihre Zahl betrug in der Regel zwei, seltener vier. Beim vierten der erwähnten Chromozentren erfolgte regelmäßig etwa in der Linie der äußeren Nu-

cleolusbegrenzung eine Aufteilung in zwei mal zwei Subchromonemata, die für sich in einem spitzen Winkel zueinander in das Kernkörperchen eindringen. Sie führten dann noch ein bis zwei Windungen umeinander aus; um dann, wie bei den anderen Chromozentren beobachtet, getrennt voneinander in der Nucleolarsubstanz zu verschwinden. Auch hier

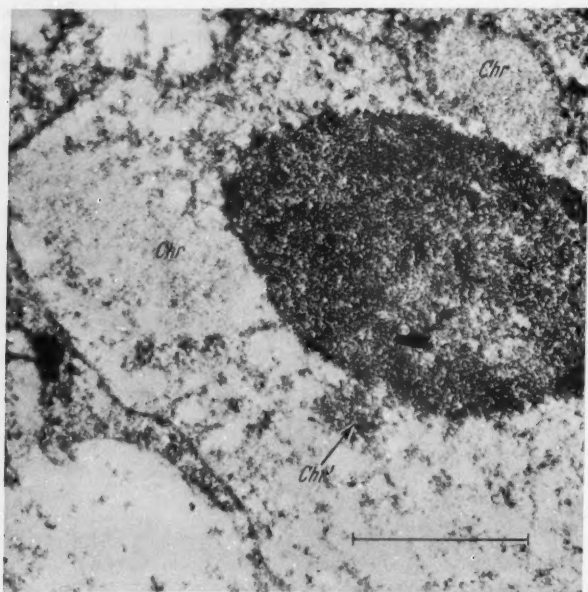


Abb. 4. Zellkern nach ALTMANN fixiert. Zwei Chromozentren (*Chr*) zeigen Kontrastminderung, ein weiteres mit dem Nucleolus verbundenes (*Chr'*) eine kräftige Elektronenstreuung. Pr.-Vergr. 7500  $\times$ , Endvergr. 28000  $\times$

konnte das Vorkommen einer doppelten Anzahl von Subchromonemata, d.h. acht, die sich in zwei mal vier aufteilten, als wahrscheinlich angenommen werden. Die Kontrastaufhellung mit Altmannschen Gemisch trat in den Chromozentren bis in die letzten Verästelungen ein (Abb. 2).

Im Gegensatz zu diesen vier heterochromatischen Bezirken wurde bei zwei weiteren, die unmittelbar am Nucleolus lagen, stets eine kräftige Elektronenstreuung festgestellt. Sie waren mit dem Nucleolus durch aufgeschraubte Fibrillen verbunden, die innerhalb des Nucleolusraumes nicht weiter verfolgt werden konnten. In ihrer Feinstruktur unterschieden sich diese Chromozentren nicht von den übrigen; gegenüber dem Nucleolus fehlte ihnen die dort vorhandene globuläre Komponente (Abb. 4 und 6).



## 4. Lichtmikroskopisch nicht sichtbare Chromozentren

In polyploiden Zellkernen fielen lichtmikroskopisch Chromozentren auf, die sehr klein waren und perlschnurartig in einer Reihe lagen. Grund-

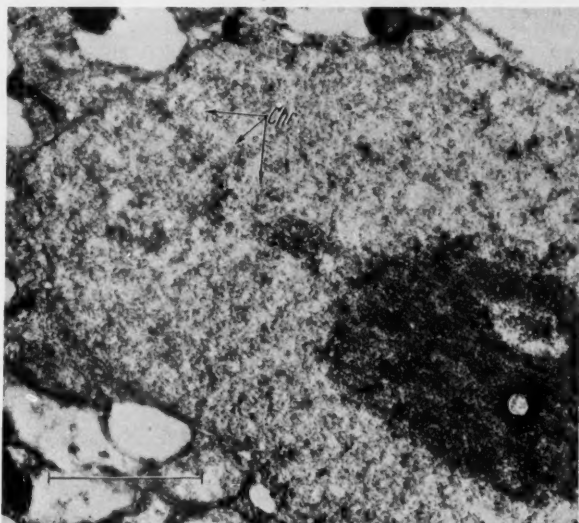


Abb. 5. Zellkern mit mehreren unter  $0,2 \mu$  großen Chromozentren (Chr), die in einer Reihe angeordnet liegen. Fix. OsO<sub>4</sub>; Pr.-Vergr. 7500  $\times$ , Endvergr. 24000  $\times$

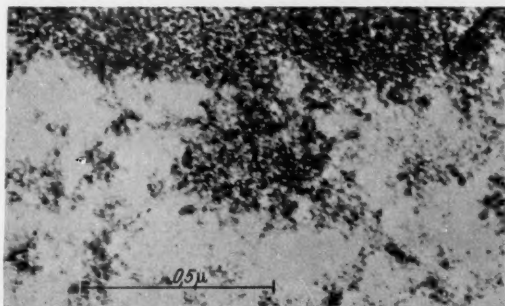


Abb. 6. Ein am Nucleolus liegendes und mit diesem verbundenes Chromozentrum bei stärkerer Vergrößerung. Fix. ALTMANN; Pr.-Vergr. 20000  $\times$ , Endvergr. 60000  $\times$

sätzlich muß für alle heterochromatischen Bezirke, die erst durch endomitotische Vorgänge in den Bereich des Sichtbaren rücken, angenommen werden, daß sie auch in diploiden Zellkernen vorhanden sind.

Nach  $\text{OsO}_4$ -Fixation wurden gelegentlich Strukturen angeschnitten, die in Lage, Größe und Feinbau diesen in diploiden Zellkernen nicht-sichtbaren Chromozentren entsprechen könnten (Abb. 5). Untereinander waren alle unter  $0,2 \mu$  großen Chromozentren im Kontrast und in ihrem sublichtmikroskopischen Feinbau gleichwertig und häufig miteinander durch euchromatische, geschraubte Fibrillen verbunden (Abb. 7). Die vergleichende Fixation mit Altmannischem Gemisch zeigte an diesen Stellen Kontrastaufhellung (Abb. 8).

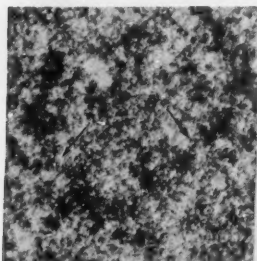


Abb. 7

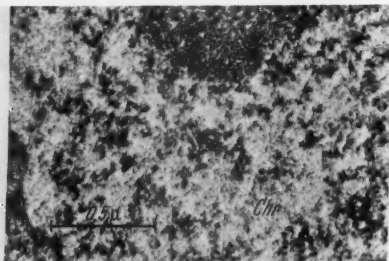


Abb. 8

Abb. 7. Ausschnitt aus der Abb. 5. Die Pfeile markieren die euchromatischen Verbindungs-fibrillen zwischen den Chromozentren. Pr.-Vergr. 7500  $\times$ , Endvergr. 32000  $\times$

Abb. 8. Ausschnitte aus einem Zellkern nach Altmann-Fixation mit sublichtmikroskopisch kleinen Chromozentren (Chr). Pr.-Vergr. 7500  $\times$ , Endvergr. 32000  $\times$

### Besprechung und Ergebnisse

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an den Zellkernen der Wurzelspitze von *Urtica pilulifera* zeigten übereinstimmende Befunde mit früheren Arbeiten (ROSSNER 1959, PEVELING) in bezug auf den Feinbau der Chromozentren aus schraubig gewundenen Fäden, in der annähernd gleichen Größenordnung dieser Feinbauelemente und im Fehlen von Strukturen, die sich mit der lichtmikroskopisch sichtbaren Matrix vergleichen ließen. Ferner wurde stets eine Kontrastaufhellung der Chromozentren nach Fixation mit ungepuffertem Altmannischem Gemisch beobachtet, die sich auch durch Nachkontrastierung nicht aufheben ließ.

Der Eindruck dieser Kontrastminderung kommt durch eine geringere Elektronenstreuung an den einzelnen Fäden zustande, verbunden mit einem Auseinanderrücken, so daß größere optisch leere Interfibrillär-räume entstehen. Die Quellung der Chromozentren, die bis zu einem Drittel ihres Durchmessers betrug, kommt damit einer „Verdünnung“ gleich und erhöht subjektiv den Eindruck der Kontrastminderung.

Die am Nucleolus liegenden dicht aufgeschraubten Areale, die sich nach beiden angewandten Fixationen stark kontrastieren ließen, reagier-

ten lichtmikroskopisch feulgenpositiv, während mit basischen Farbstoffen keine Anfärbung gelang. Sie waren mit dem Nucleolus verbunden und unterschieden sich in ihrer Struktur von diesem dadurch, daß ihnen die granuläre Komponente fehlte. Es bestehen daher keine Bedenken, sie trotz des abweichenden Verhaltens als Chromozentren anzusprechen. Nach Altmann-Fixation konnten zwischen stark kontrastierten Bezirken kleinere beobachtet werden, die den übrigen Chromozentren ähnlich sahen. In diesem Zusammenhang muß an die Befunde bei *Sinapis alba* erinnert werden, wo im Interphasenkern der Wurzelspitze Chromatin gefunden wurde, das ebenfalls mit dem Nucleolus in Verbindung stand, Kontrastaufhellung nach Altmann-Fixation zeigte, doch lichtmikroskopisch feulgennegativ reagierte und mit basischen Farbstoffen darstellbar war. Während des Mitoseablaufes waren diese Stellen zu einem Zeitpunkt, in dem der Nucleolus noch nicht aufgelöst war, kaum von den übrigen Chromosomenabschnitten zu unterscheiden (ROSSNER 1959). In allen drei Fällen handelt es sich also einwandfrei um Chromatin von sublichtmikroskopischähnlicher Struktur, jedoch offensichtlich ehemisch unterschiedlicher Zusammensetzung.

Der Nachweis, daß vier Chromozentren einschließlich ihrer Fortsätze im Nucleolus einheitlich heterochromatisch sind, konnte eindeutig erbracht werden. Bemerkenswert ist die optisch leere Zone, welche die Fortsätze vom Nucleolarmaterial bis auf die direkte Verlängerung ihrer Schraubenwindungen trennt. Eine Artefaktstruktur ist in diesem Falle sehr unwahrscheinlich, denn sie könnte nur durch Schrumpfung von Nucleolus oder Chromozentrum zustande kommen. Nach Altmann-Fixation quellen aber Chromozentren, und eine Schrumpfung des Nucleolus müßte auch an der Grenze zum Euchromatin hin nachweisbar sein.

TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA beobachteten an polyploiden Epidermis- und Trichomzellen im Lichtmikroskop die Fortsätze, die dann in Nucleolusblasen enden sollen. Diese Blasen sind wohl identisch mit den beschriebenen optisch leeren Zonen, wobei durch den Polyploidiegrad die Strukturen sichtbar wurden. Eben solche Vakuolen innerhalb der Chromozentren konnten allerdings nie beobachtet werden. Genauso erscheint es nicht sicher, ob diese oder die sich stets stark kontrastierenden Chromozentren als Trabanten anzusehen sind.

Ebenfalls eine Frage der Dimension ist das Sichtbarwerden von Chromozentren, die in diploiden Zellkernen  $0,2\ \mu$  und kleiner sind. Der Nachweis von kleineren Arealen kräftig kontrastierter und dicht aufgewundener Schraubenstrukturen im Zellkern nach  $\text{OsO}_4$ -Fixation reicht jedoch zur Identifizierung des Heterochromatins nicht aus, da frühe Prophasen einen ähnlichen Aspekt bieten können. Aber auch sublichtmikroskopische, unter  $0,3\ \mu$  große Chromozentren verhielten sich nach

Fixation mit  $\text{OsO}_4$ -Kaliumbichromat-Gemisch wie das übrige Heterochromatin und im Gegensatz zu Prophasechromosomen, so daß ihr Nachweis als gesichert gelten kann.

### Zusammenfassung

An Hand von Ultradünnschnitten durch die Wurzelspitze von *Urtica pilulifera* wurde mit Hilfe vergleichender Fixationen von  $\text{OsO}_4$  und einem ungepufferten Altmannschen Gemisch versucht, spezielle Fragen der Chromozentren-Feinstruktur zu klären.

1. Alle angeschnittenen Chromozentren zeigten in ihrer sublichtmikroskopischen Feinstruktur ohne Ausnahme einen Aufbau aus schraubig gewundenen Fibrillen.

2. Die Fixation mit Altmannschem Gemisch bewirkte in den Chromozentren eine erhebliche Kontrastminderung und Quellung durch Vergrößerung der Interfibrillarräume. Schraubig gewundene Fäden in der Größenordnung von Chromonemata wurden kaum gefunden.

3. Eine Ausnahme von der Kontrastminderung wurde beschrieben und die mögliche Ursache diskutiert.

4. Chromozentren, die mit aufgeschraubten fibrillären Fortsätzen weit in den Nucleolus hineinreichen, wurden nachgewiesen. Diese Fortsätze zeigten Kontrastminderung wie die Chromozentren und waren von der Nucleolarsubstanz streng gesondert.

5. Es wurden Strukturen beschrieben, die mit lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Chromozentren diploider Zellkerne identisch sein können.

### Literatur

- AMANO, S., S. DOHI, H. TANAKA, F. UCHINO and M. HANAOKA: The structure of the nucleus by electron microscopy in ultrathin sections with special reference to the chromonema. *Cytologia (Tokyo)* **21**, 241—251 (1956).
- BOLOGNARI, A.: Sui caratteri ultrastrutturali nei nucleoli degli ovociti in accrescimento di alcune specie di Molluschi. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **35**, 479—483 (1959).
- BOFF-HASSENKAMP, G.: Lichtmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen über den Aufbau pflanzlicher Chromosomen im Pachytän der Meiosis; *Protoplasma (Wien)* **50**, 243—268 (1959). — Untersuchungen über die submikroskopische Fibrillenstruktur von Kern und Nucleolen. *Z. Naturforsch.* **14b**, 188—194 (1959). — Weitere elektronenoptische Untersuchungen am pflanzlichen Zellkern während der Meiosis. *Z. Zellforsch.* **52**, 238—247 (1960).
- BRUGGEN, E. F. J. VAN, E. H. WIEBENGA and M. GRUBER: Negativ-staining electron microscopy of proteins at pH values below their isoelectric points. *Biochem. biophys. Acta* **42**, 171—172 (1960).
- CHARDARD, R.: L'ultrastructure des chromosomes métaphasiques d'une orchidée. Étude au microscope électronique; *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **250**, 1894—1896 (1960).
- DALES, S.: A study of the fine structure of mammalian somatic chromosomes. *Exp. Cell Res.* **19**, 577—590, (1960).

- GEITLER, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia*, Bd. VIc. Wien: Springer 1953.
- HEITZ, E.: Heterochromatin, Chromozentren, Chromomeren. *Dtsch. bot. Ges.* **47**, 274—284 (1929). — Die Herkunft der Chromozentren. *Planta (Berl.)* **18**, 571—636 (1933).
- HERTL, M.: Zum Nucleolus-Problem; *Z. Zellforsch.* **46**, 18—51 (1957).
- MARQUARDT, H., W. LIESE u. G. HASSENKAMP: Die elektronenoptische Feinstruktur pflanzlicher Zellkerne. *Naturwissenschaften* **43**, 540—541 (1956).
- MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J., and J. C. W. CRAWLEY: The fixation of chromosomes for electron microscopy. *Exp. Cell. Res.* **20**, 211—213 (1960).
- PEVELING, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellkernen von *Cucumis sativus* L. *Planta (Berl.)* **56**, 530—554 (1961).
- ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15. Aufl. München 1948.
- ROSSNER, W.: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Einfluß von Streptomycin auf *Sinapis alba* mit einem Beitrag zur elektronenoptischen Feinstruktur des Interphasenkernes. Diss. Münster 1959. — Elektronenoptische Kontrastierbarkeit von Chromozentren. *Naturwissenschaften* **48**, 228—229 (1961).
- STRUGGER, S.: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. *Naturwissenschaften* **43**, 357 (1956). — Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen an der meristematischen Pflanzenzelle. II. *Naturwiss. Rdsch.* **13**, 51—60 (1960).
- THOENES, G.: Die submikroskopische Struktur des Barrschen Zellkernkörpers (des sog. Geschlechtschromatins). *Naturwissenschaften* **48**, 388—389 (1961).
- TSCHERMAK-WOESS, E., u. G. HASITSCHKA: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose; rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen; *Chromosoma (Berl.)* **5**, 574—614 (1953).
- WOHLFAHRT-BOTTERMANN, E.: Cytologische Studien VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel. *Protoplasma (Wien)* **53**, 259—290 (1961).
- YASUZUMI, G.: Licht- und elektronenmikroskopische Studien an kernhaltigen Erythrocyten. *Z. Zellforsch.* **52**, 325—335 (1960).

Dr. WOLF ROSSNER,

Botanisches Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe

From the Estação Agronómica Nacional, Oeiras, Portugal  
A SPONTANEOUS DERIVATIVE OF ABNORMAL  
CHROMOSOME 10 IN MAIZE \*

By

T. MELLO-SAMPAYO

With 13 Figures in the Text

(Received September 1, 1961)

Introduction

Neo-centromeres or secondary centric regions are associated in maize with the presence of an abnormal chromosome 10 in both heterozygous and homozygous conditions (RHOADES and VILKOMERSON 1942).

According to RHOADES (1952, 1955) this abnormal chromosome 10 shows in the distal part of its long arm, at pachytene stage, a pairing segment bearing 3 prominent chromomeres (or small knobs) not existing in the corresponding sites of its normal partner, which ends a little beyond the most distal of these chromomeres.

An extra chromosomal piece follows the above mentioned segment in the abnormal chromosome 10. This additional piece is composed of two euchromatic segments one on each side of a large heterochromatic knob. These euchromatic segments have different length, the most distal being the shortest.

Close to the proximal end of the heterochromatic knob, there is another conspicuous chromomere (EMMERLING 1959), whose presence is frequently masked due to its being stuck to the neighbouring knob.

It is in this composite distal region of abnormal chromosome 10 that the agents for the neo-centric activity are presumed to be located since neo-centromeres never arose in its absence.

All parts of the abnormal chromosome 10 are supposed to be exchangeable through crossing-over, with the corresponding ones of its normal partner, except in the distal region. Although the pairing between the two kinds of chromosome 10 is intimate, crossing-over is prevented in the 3 dissimilar chromomere region probably due to structural heterozygosity (RHOADES 1952). KIKUDOME (1959) found that, in an individual heterozygous for abnormal chromosome 10, crossing-over between *R* and *Sr<sub>2</sub>*, the most distal known loci of the long arm of chromosome 10, occurred always to the left of the most proximal of the three distinctive chromomeres.

\* This work has been partly done in the United States, under an I.C.A. — National Academy of Sciences fellowship.

Therefore this peculiar distal region of abnormal chromosome 10 segregates always as an indivisible block. In fact it has never been divided through crossing-over.

Lately EMMERLING (1959) has succeeded in obtaining an x-ray ring derivative of abnormal chromosome 10. Crossovers in plants heterozygous for the ring and a normal chromosome 10 produced two chromosomes lacking certain portions of the standard abnormal 10. The deletions comprised, besides the small distal euchromatic segment, about one half of the heterochromatic knob in one case and the whole knob in the other. In both cases the three chromomere region was maintained.

Neo-centromeres were formed in individuals homozygous for both kind of modified abnormal chromosomes 10<sup>1</sup>.

RHOADES (1955) found that the maximum number of neo-centromere bearing dyads at MII was equal to the number of knob bearing chromosomes and that neo-centromeres were likely to be formed near the ends of long arms. This seems to assign to the knobs a definite role in the formation of neo-centric regions.

Through a further finding the same author showed that knobs were not active when detached from the true centromere, this pointing to a relationship between centromere and knob.

On these grounds it was proposed that the abnormal chromosome 10 gave rise to an over-production of fiber-forming substance at the true centromere regions. Some of this substance would move distally along the chromosome arms, the knobs being active either in stimulating accessory fiber production or in attracting more substance to the arms in which they are located.

A very important discovery was that of RHOADES (1942) and LONGLEY (1945) who found that the abnormal chromosome 10 was also responsible for preferential segregation at megasporogenesis in individuals heterozygous for knobbed chromosomes.

Data presented by the latter and by KIKUDOME (1959) in chromosome 9 as well as by RHOADES and DEMPSEY (1957) in chromosome 3 are positive in suggesting a particular influence of knobs on preferential segregation. In fact, the most frequently recovered genes, when abnormal 10 is present, are the closest or the most intimately linked to the knobs. This seems to mean that the knob is the physical entity involved in preferential segregation. Under these circumstances, genes which lie closer to knobs would be more preferentially segregated.

<sup>1</sup> It seems however that the number of dyads with neo-centromeres varied in different strains.



Therefore, there is some indirect evidence that preferential segregation and neo-centric activity are correlated. Both are dependent on the abnormal chromosome 10 and have their expression through knobs.

To account for this relationship RHOADES (1952) presented a hypothesis which assumes neo-centromere activity as the physical basis of the mechanism of preferential segregation. He suggested that early spindle attachment and pulling of knob bearing chromatid arms to the spindle poles by the neo-centromeres in both meiotic divisions, might cause the orientation of these arms toward the periphery of the cell at first division and their inclusion — since no change of orientation is expected at interphase — in the top and the bottom cells of the tandemly arranged group of 4 megaspores, following second division. The functional megaspore is therefore one of the two cells to which the knobbed chromosomes are preferentially segregated.

Obviously preferential segregation of a knob, in an individual heterozygous for that knob, takes place only when a crossing-over occurs between the centromere and the knob so that dyads with knobbed versus knobless chromatids are formed.

This is a preliminary report on morphological aspects of a new type of abnormal chromosome 10 and their bearing on the problem of neo-centromeres in maize.

Tests on preferential segregation in plants carrying such a chromosome are being performed. The results will be published in a further paper.

#### Material and methods

TING (1958a and b) reported the occurrence of an abnormal chromosome 10 in a plant of maize obtained from a cross involving a variety collected from Latin America. From his stocks a few seeds of a  $F_2$  progeny were kindly sent. Most of them carried an abnormal type of chromosome 10 but, because the morphology of this chromosome is entirely different from that described by TING, it is assumed that another form of chromosome 10 was present or arose in his stocks<sup>1</sup>.

From the plants obtained, several homozygous for abnormal chromosome 10 were crossed with others of a different origin which were also homozygous for an abnormal chromosome 10. The latter were grown from seeds supplied by Dr. G. KIKUDOME, of the Department of Field

<sup>1</sup> In fact, TING (1958b) refers to an abnormal type of chromosome 10, which was presumably composed of a normal chromosome 10 and an additional piece attached to the end of the long arm and resembling, "grosso modo", the extra chromosomal piece earlier described by RHOADES (1955) for the orthodox abnormal chromosome 10. Because of the addition of this extra piece, the chromosome becomes about one-fifth longer than the normal one. On the contrary, the abnormal chromosome 10 we found has about the same length as the normal chromosome 10, and it has a peculiar morphology in the distal part of its long arm, as it will be shown in the following description.

Crops, University of Missouri. The abnormal chromosome 10 they carried was derived from the one described by RHOADES (1952) and produced neo-centromeres in both meiotic divisions.

Aceto-carmin smears were prepared of microsporocytes from plants homozygous and heterozygous for both abnormal chromosome 10 types, as well as from hybrids between these abnormal chromosome 10 stocks. PMC's of a homozygous normal chromosome 10 strain (KYS) were also smeared in the same way.

In order to facilitate further descriptions we will designate the two types of abnormal chromosome 10 as S abnormal 10 (TING's stock) and R abnormal 10 (KIKUDOME's stock).

### Observations

#### *1. Comparative morphology of abnormal chromosomes 10*

Earlier observations of pachytenes gave us the impression that S abnormal 10 was morphologically different from R abnormal 10 in the distal region of the long arm. This arm seemed to be shorter in S homozygous individuals, its knob being smaller than usual (compare Figs. 1 and 5).

In heterozygous plants where this chromosome was paired with a normal one, the differences were still more evident since the S abnormal 10, instead of showing an additional segment in its long arm, as in the case of R abnormal 10, was accompanied by its normal partner throughout its length (compare Figs. 3 and 6).

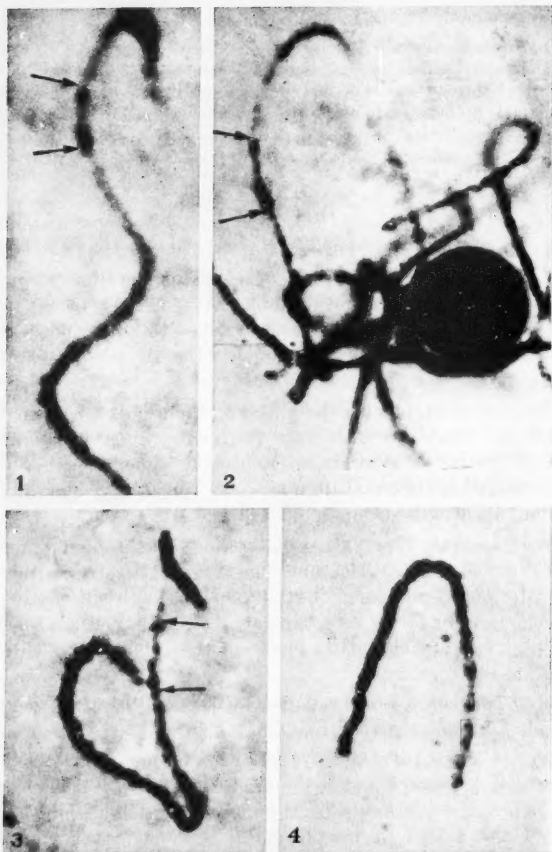
A more accurate observation of the knob in the homozygous individuals revealed that each chromosome was constituted in this region of two adjacent chromomeres heavily charged with chromatin. These chromomeres were rarely seen separated since they stuck together to form a dark staining chromatin block. A third lightly stained chromomere is located distally.

Pairing between S abnormal 10 and normal 10 was intimate along the whole chromosome (Fig. 6).

Therefore, since these observations threw some doubt on the complete identity between S and R abnormal 10, crosses were made between plants carrying both kinds of chromosomes. The hybrids perfectly displayed the extent of morphological differences between the two chromosomes (Fig. 2).

Bivalents composed of S and R abnormal chromosomes 10 were double-stranded up to the most distal chromomere of the three distinct chromomere region of R abnormal 10, the remainder of the R chromosome being single as when it pairs with the normal 10 (Fig. 3).

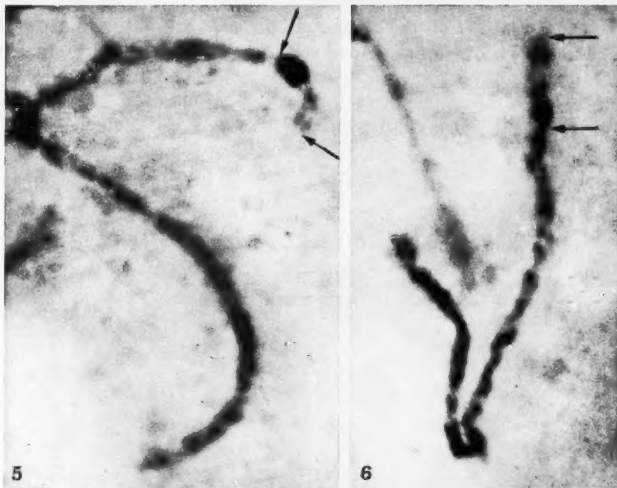
Pairing of the terminal region of S abnormal 10 was as follows: the two chromomeres involved in the knob paired with the first two



Figs. 1—4. Pachytene bivalents of chromosome 10 of maize. The arrows limit the 3 dissimilar prominent chromomere region.  $\times 2000$ . — Fig. 1. Homozygous bivalent of orthodox abnormal chromosome 10 (R abnormal 10). — Fig. 2. Heteromorphous bivalent composed of R abnormal 10 and the newly found abnormal chromosome 10 (S abnormal 10). Notice the striking similarity between the prominent chromomere regions of Figs. 1 and 2 and also the abrupt ending of S abnormal 10 at the chromomere near the topmost arrow. — Fig. 3. Heteromorphous bivalent showing an orthodox abnormal chromosome 10 paired with a normal one. The normal chromosome ends a little beyond the most distal prominent chromomere. — Fig. 4. Homozygous bivalent of a normal chromosome 10

ones of the 3 distinct chromomeres of R abnormal 10, and the light staining chromomere paired with the third and most distal one.

It became clear that the knob-forming chromomeres of S abnormal 10 carried more heterochromatin than their homologues in the R chromosome, the opposite being true in regard to the most distal chromomere.



Figs. 5 and 6. Pachytene bivalents of chromosome 10 in maize. (Arrows as in Figs. 1—4.)  $\times 3000$ . — Fig. 5. Homozygous bivalent of the newly found abnormal chromosome 10 (S abnormal 10). The two most proximal prominent chromomeres form a knob. — Fig. 6. Heterozygous bivalent formed by a normal chromosome 10 and the newly found abnormal one. The long arm of the normal chromosome seems to surpass the tip of the abnormal one.

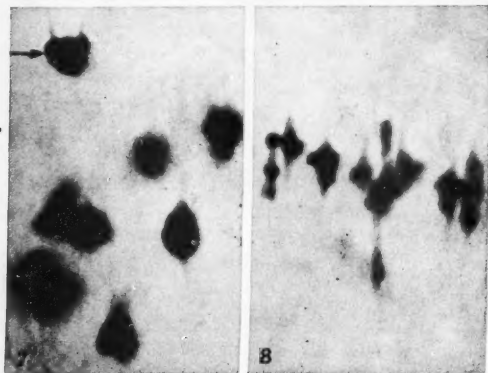
Comparing Figs. 1 and 2, we find great morphological similarities in the segment including the three chromomeres (limited by arrows). However, in the heteromorphic bivalent of Fig. 2 the greater amount of chromatin supplied by S abnormal 10 makes the first two chromomeres when stuck together in the bivalent, appear as an heterochromatic mass, larger than in a homozygous R abnormal 10 (Fig. 1).

The most distal of these three chromomeres frequently displays, in the heteromorphic bivalents, a double structure in both chromosomes as is observed in Fig. 2.

Fig. 4 represents a normal chromosome 10 bivalent which as expected, does not show either prominent chromomeres or knobs at the distal part of its long arm.

From the above description, it seems that S abnormal 10 corresponds morphologically to a deficient R abnormal 10, from which the already mentioned additional piece (segment beyond the top-most arrow of Fig. 3) is missing. If we compare the bivalents of Figs. 3 and 6, in which each type of abnormal 10 (R and S) is paired with a normal 10, we see that what is missing in S abnormal is really the distal extra-segment of R abnormal 10.

Fig. 6 shows one of the characteristic features of the pairing of S abnormal 10 with its normal partner in the distal region of the long arm. The normal 10 seems to extend beyond the end of S abnormal 10 and to be unpaired at its tip. However, it is difficult to decide if a true deficiency of S abnormal 10 is involved.



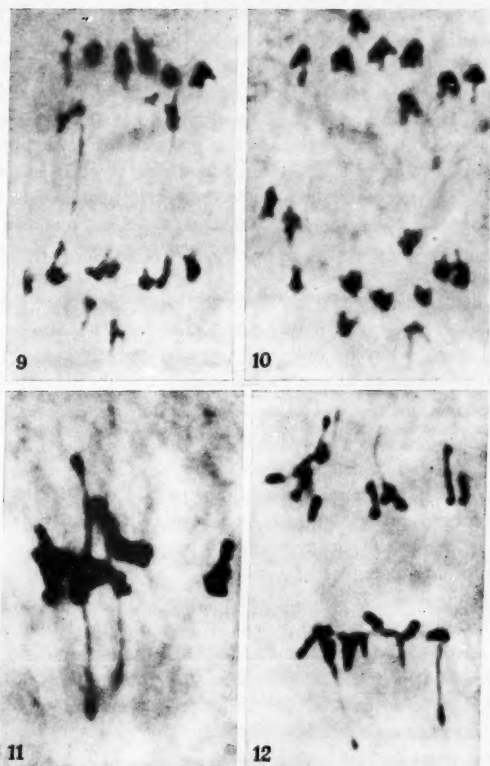
Figs. 7 and 8. Meiotic aspects of chromosomes in microsporocytes of maize carrying the newly found abnormal chromosome 10 and showing neo-centric activity. — Fig. 7. Pro-metaphase I with early half spindle attachments in a bivalent (arrow).  $\times 1500$ . — Fig. 8. Metaphase I with asynchronously dividing bivalents.  $\times 1000$

## 2. Neo-centromeres

Plants carrying S abnormal 10 in either homozygous or heterozygous condition showed neo-centric activity of chromosomes in both meiotic divisions.

In the first division, early spindle attachment of the chromosome extremities (Fig. 7, arrow) was rarely seen. Most metaphases I were perfectly normal and there were very few cases in which neo-centromeres were apparent at this stage (Fig. 8). However, we noticed a great asynchrony in the division of the bivalents, some of them being more advanced toward anaphase.

Neo-centromere activity was first detected in middle anaphase I (Figs. 9 and 10). Some chromosomes start to be pulled at their ends



Figs. 9—12. Meiotic aspects of chromosomes in microsporocytes of maize carrying the abnormal chromosome 10 and showing neo-centric activity. — Figs. 9 and 10. Anaphase I showing chromosomes with a low degree of neo-centric activity.  $\times 500$ . A chromatid bridge is seen in Fig. 9. — Figs. 11 and 12. Metaphase II and anaphase II showing neo-centric activity (higher than in first division) in some chromosomes.  $\times 1000$ . Notice the intense stickiness of the chromosomes

(on one or both sides) and take the lead to the poles. Sometimes the movement of a chromosome is delayed, either because of fusion to its homologue or because one of its arms is pulled toward the opposite pole. In the latter case a chromatid bridge is formed.

Neo-centric activity reappears at second prophase and prometaphase II. Here, the intensity of this phenomenon is much higher than at first division and neo-centromeres are quite evident (Figs. 11 and 12) since the chromatid arms are stretched toward the spindle poles at metaphase. However, neo-centric activity never reached the high intensities recorded in the stocks of RHOADES and VILKOMERSON (1942).

Since neo-centric activity begins early in the second meiotic division, chromosome ends are pulled toward the poles before any spindle structure is visible. Polarity is therefore functional at early stages of this division. In fact, neo-centromeres are very early attached to their half spindle fibers and consequently what seems to stretch the chromosome arms is the movement of its true centromere to the equatorial plate, in some cases.

In this material very few chromosome arms exhibit an intense neo-centric activity. This is probably due to the fact that knobs are small to medium sized. They do not stick together very frequently although stickiness is pronounced at contracted stages, mainly in second division.

#### Discussion

The account here presented gives sufficient basis to conclude that S abnormal 10 is, to some extent, structurally similar to one of the modified chromosomes obtained by EMMERLING (1959) from a ring involving an abnormal chromosome 10, namely that one in which the distal euchromatic segment and the whole heterochromatic knob were missing (designated  $K^0$  by the author, see Fig. 13b). As is seen in Fig. 13c, these parts are also absent in S abnormal 10, which ends at the most distal of the 3 characteristic chromomeres. Therefore, this chromosome may be considered as a derivative of R abnormal 10 (Fig. 13a), the piece beyond the third prominent chromomere having been lost through spontaneous breakage.

There is little doubt that a factor or factors responsible for neo-centric activity are located in the distal segment of the long arm of abnormal chromosome 10 that undergoes no crossing-over when this chromosome pairs with the normal one. This segment we will designate the "telo-segment".

The telo-segment has its proximal end at the left of the most proximal of the 3 dissimilar chromomeres. It is likely that it begins not very far to the right of the *R* locus and before the *Sr*<sub>2</sub> locus is reached. RHOADES (1952) found that there was 1% recombination between *R* and the most proximal of the three dissimilar chromomeres. KIKUDOME



(1959) showed that crossing-over between  $R$  and  $Sr_2$  was drastically reduced in individuals heterozygous for abnormal chromosome 10.

The production of a deficient abnormal chromosome 10 ( $K^0$ ) by EMMERLING (1959) which retains the ability to induce neo-centromeres, indicates that a shorter piece of the telo-segment is responsible for neo-centric activity. This small piece would have its distal limit just proximal to the heterochromatic knob. In the case of  $S$  abnormal 10, the deficiency is slightly larger, the end of the chromosome being coincident

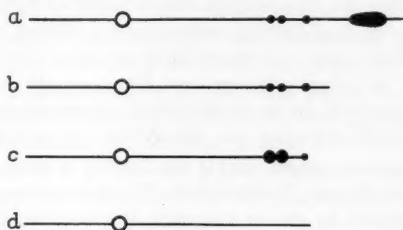


Fig. 13a—d. Comparative morphology of the various types of abnormal chromosomes 10 in maize. a Orthodox abnormal chromosome 10 ( $R$  abnormal 10). b Modified abnormal chromosome 10 (EMMERLING's  $K^0$ ). c Newly found abnormal chromosome 10 ( $S$  abnormal 10). d Normal chromosome 10, for comparison

with the distal chromomere. A factor or factors for neo-centric activity are likely to be located in this segment.

It is reasonable to assume that further deletions of the 3 chromomere region would lead to gamete inviability since this is the part of the telo-segment that pairs with the distal segment of the long arm of normal 10.

Since limits for a minimum segment responsible for neo-centric activity have been suggested, a problem arises in regard to the role of the remaining distal parts of the telo-segment.

EMMERLING (op. cit.) found a low degree of neo-centric activity in plants homozygous for both her deleted abnormal chromosomes. The same has been observed by us concerning  $S$  abnormal 10. If the variation introduced by different stocks is ignored, we might assume that the missing parts contain additional factors for the neo-centric activity.

On the other hand, since the abnormal chromosome 10 is assumed to stimulate spindle-fiber production at the knobs, we might postulate a dual role of the telo-segment because it carries distally a large knob which must itself constitute a site of precocious spindle fiber attachment.

This point must be emphasized since it is likely that these two complementary functions, stimulation and local production of precocious chromosomal fibers at the neo-centromeres, although residing together in the telo-segment, are probably independently controlled. Actually this concept may be deduced from RHOADES' theory on the mechanism of chromosome fiber production and from the most acceptable hypothesis that abnormal chromosome 10 activates all knobs of the chromosome complement, including its own.

In these terms, we may suggest that a factor or factors controlling over-abundance of fiber-forming substance are located in the 3 dissimilar chromomere region of abnormal chromosome 10. The ultimate production of precocious chromosomal fibers would depend, in the abnormal chromosome 10 as in the other chromosomes of the same complement, on the presence and specificities of its knob.

It is reasonable to assume that if this knob is missing, as in the case of S abnormal 10 and EMMERLING's  $K^0$  chromosome, its function would be transferred to the next smaller, heterochromatic and distally located mass of the chromosomal strand. The two most proximal, confluent and prominent chromomeres of the 3 dissimilar chromomere region form, when stuck together, a small knob which is likely to become activated as a precocious spindle fiber attachment and a site of preferential segregation. KIKUDOME (1959) has shown that a small knob at the end of the short arm of chromosome 9 was preferentially segregated against a knobless homologue in plants heterozygous for abnormal chromosome 10. Therefore we may assume that the terminal portion of the deleted long arm of abnormal chromosome 10 may become functional since it bears also a small knob. On the other hand, transference of the neo-centric activity to a smaller knob in these deleted abnormal chromosomes 10 might partly explain the reduced preferential segregation of the *R* locus.

**Acknowledgements.** Thanks are due to Dr. MARCUS M. RHOADES, chairman of the Department of Botany, Indiana University for his excellent hospitality and valuable advice during our stay in his laboratory.

We are also indebted to Dr. Y. C. TING, from the Botanical Museum, Harvard University and Dr. G. KIKUDOME from the Department of Field Crops, University of Missouri for their kind supply of seeds.

We would like also to express our gratitude to Miss ELLEN DEMPSEY from the Department of Botany, Indiana University, for reading the manuscript and offering valuable suggestions.

### Summary

A new type of abnormal chromosome 10 has been found among maize plants grown from seeds sent by Dr. Y. C. TING of Harvard

University. This chromosome deviates in its morphology from the orthodox abnormal chromosome 10 described by RHOADES (1952) and from the one described by TING (1958b). It produces a low degree of neo-centric activity.

Cytological observations of plants heterozygous for the new abnormal chromosome 10 and either an orthodox abnormal chromosome 10 or a normal one, have suggested that the new type was derived from an orthodox abnormal 10 through spontaneous breakage and loss of an important piece of its long arm. The deletion involved the distal part of the long arm of orthodox abnormal chromosome 10, proximally limited by the third most distal dissimilar and prominent chromomere. This corresponds approximately to the extra segment at the end of orthodox abnormal chromosome 10 which remains unpaired in heterozygotes with the normal 10. It bears a large heterochromatic knob. The missing piece is a part of the larger fraction of the long arm of orthodox abnormal chromosome 10 that remains unaffected by crossing-over in a heteromorphic bivalent having a normal chromosome 10 (telo-segment). The telo-segment has its proximal limit at the left of the most proximal of the 3 dissimilar chromomeres, probably between the *R* and *Sr*<sub>2</sub> loci. It has been proposed that a factor or factors responsible for neo-centric activity are located in the portion of the telo-segment between its proximal limit and the third most distal dissimilar chromomere (3 dissimilar chromomere region).

Since the telo-segment of the orthodox abnormal 10 also bears a large knob in its distal half, it has been suggested that this segment has a dual role in neo-centric activity. The factor or factors located in the proximal piece of the telo-segment would stimulate over-abundance of fiber-forming substance, whereas local production of chromosomal fibers would depend ultimately on the knob's activity.

If the large knob is absent, its role in neo-centric activity would be transferred to the next smaller and distally located heterochromatic mass, such as the knob-like body near the end of the new abnormal 10 which results from the fusion of the two most proximal prominent chromomeres of the telo-segment.

### Bibliography

- EMMERLING, MARGARET H.: Preferential segregation of structurally modified chromosomes in maize. *Genetics* **44**, 625—645 (1959).  
KIKUDOME, G.: Studies on the phenomenon of preferential segregation in maize. *Genetics* **44**, 815—831 (1959).  
LONGLEY, A.: Abnormal segregation during megasporogenesis in maize. *Genetics* **30**, 100—113 (1945).

- RHOADES, M. M.: Preferential segregation in maize. *Genetics* **27**, 395—407 (1942). — Preferential segregation in maize. *In* *Heterosis*, edit. by JOHN W. GOWEN, p. 68—80. Ames: Iowa State College Press. 1952. — The cytogenetics of maize. *In* *Corn and Corn Improvement*, edit. by G. F. SPRAGUE, p. 123—219. New York: Academic Press 1955.
- , and ELLEN DEMPSEY: Further studies on preferential segregation. *Maize Genetics Coop. News Letter* **31**, 77—80 (1957).
- , and HILDA VILKOMERSON: On the anaphase movement of chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **28**, 433—436 (1942).
- TING, Y. C.: The origin of abnormal chromosome 10 in maize. *Maize Genetics Coop. News Letter* **32**, 42—43 (1958a). — On the origin of abnormal chromosome 10 in maize (*Zea mays* L.). *Chromosoma (Berl.)* **9**, 286—291 (1958b).

T. MELLO-SAMPAYO  
Estação Agronómica Nacional,  
Oeiras, Portugal

